

TOBIAS JANKE

**MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
PILZDIVERSITÄT IN STALL- UND HAUSSTAUBPROBEN
MITTELS PCR-SSCP UND PARALLELSEQUENZIERUNG**



Technische Universität München

Lehrstuhl für Tierhygiene

Molekularbiologische Untersuchungen zur
Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben
mittels PCR-SSCP und Parallelsequenzierung

Tobias Janke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. J. Bauer
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. von Mutius
(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 22.05.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.09.2013 angenommen.

© 2014 by Tobias Janke, München, Deutschland

Alle Rechte, auch die der Übersetzung und des Nachdrucks sowie jede Art der photomechanischen Wiedergabe oder der Übernahme auf Datenträger, auch auszugsweise, bleiben vorbehalten.

Technische Universität München
Lehrstuhl für Tierhygiene
Weihenstephaner Berg 3
D-85354 Freising

Herstellung: Hieronymus Verlag, Neuried

Eine elektronische Version der Dissertation ist im Netz der Universitätsbibliothek der Technischen Universität München veröffentlicht und unter der Internetadresse <http://mediatum.ub.tum.de> zu finden.

Im Gedenken an meine Mutter

24.08.1949 – 21.01.2012

„Ja, das Alles auf Ehr‘,

Das kann ich und noch mehr,

Wenn man kann’s ungefähr,

Ist’s nicht schwer – ist’s nicht schwer!“

Zigeunerbaron, Johann Strauss, 1885

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	V
II	Tabellenverzeichnis	VIII
III	Abbildungsverzeichnis	XIII
1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Pilze.....	3
2.1.1	Biologie und systematische Klassifizierung	3
2.1.2	Pilze in der Umwelt	6
2.1.3	Pilze als Humanpathogene	9
2.1.4	Zusammenhänge zwischen Pilzexposition und Asthmaprävalenz	15
2.2	Qualitativer und quantitativer Nachweis von Pilzen	17
2.2.1	Direktmikroskopie	17
2.2.2	Kulturelle Nachweisverfahren	18
2.2.3	Kulturunabhängige Nachweisverfahren	18
3	Material und Methoden.....	31
3.1	Material.....	31
3.1.1	Pilzspezies	31
3.1.2	Probenmaterial.....	33
3.1.3	Technische Geräte.....	34
3.1.4	Verbrauchsmaterial.....	36
3.1.5	Chemikalien	37
3.1.6	Herstellung der Gebrauchsmedien	39
3.2	Methoden	43
3.2.1	Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	43
3.2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	44

3.2.3	Adaption der Basismethoden an die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in der Matrix Staub.....	52
3.2.4	PCR-SSCP zur Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Staubproben (Darstellung der validierten Endmethode).....	60
3.2.5	Untersuchung der Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben	62
3.2.6	Molekularepidemiologische Untersuchungen zur Assoziation zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko bei Schulkindern (GABRIEL)	63
4	Ergebnisse	69
4.1	Adaption der PCR-SSCP Basismethode an die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Stall- und Hausstaubproben	69
4.1.1	Gezielte Auswahl und Evaluierung eines geeigneten Primerpaares.....	69
4.1.2	Auswahl eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens.....	78
4.1.3	Entwicklung eines PCR-SSCP-Pilz-Speziesstandards („Spec“)	81
4.1.4	Reproduzierbarkeit der entwickelten PCR-SSCP-Methode	82
4.2	Untersuchung der Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben.....	86
4.2.1	PCR-SSCP-Analyse	86
4.2.2	Kulturelle Untersuchungen.....	88
4.2.3	Parallelsequenzierung	89
4.2.4	Vergleich von PCR-SSCP-Analyse, Parallelsequenzierung und kulturellen Untersuchungen von Stall- und Hausstaubproben	93
4.3	Molekularepidemiologische Untersuchungen zur Feststellung von Assoziationen zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko bei Schulkindern (GABRIEL).....	94
4.3.1	PCR-SSCP-Analyse von Matratzenstaubproben (GABRIEL)	94
4.3.2	Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben (GABRIEL) – Pilotversuch	123

5	Diskussion	131
5.1	Adaption der PCR-SSCP-Analysemethode und der Parallelsequenzierungstechnologie an die Untersuchung von Stall- und Hausstaubproben	131
5.1.1	DNA-Extraktionsverfahren	131
5.1.2	Primerauswahl	133
5.1.3	Kulturunabhängige Untersuchungen von Pilzgemeinschaften mittels PCR-SSCP	138
5.1.4	Quantitative Bestimmung der Pilzexposition	142
5.2	Untersuchungen zur Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben	143
5.2.1	Kultivierungsversuche	143
5.2.2	PCR-SSCP-Analyse und Sanger-Sequenzierung	144
5.2.3	Parallelsequenzierung zur Bestimmung der Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben	146
5.3	Molekularepidemiologische Untersuchungen zur Feststellung von Assoziationen zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko bei Schulkindern (GABRIEL)	150
5.3.1	PCR-SSCP-Analyse und Sequenzierung	151
5.3.2	Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben zur Ermittlung der Diversität und der Assoziation spezifischer Sequenzen bezüglich Asthma	162
6	Schlussfolgerungen und Ausblick	167
7	Zusammenfassung	169
8	Summary	171
9	Literaturverzeichnis	173

10	Anhang	207
10.1	Anhang A: Tabellen	207
10.1.1	Anhang A1: Bestimmung der Ähnlichkeiten von SSCP-Bandenprofilen (Pearson Korrelations-Koeffizient (%)) von jeweils einer Staubprobe unterschiedlicher Herkunft)	207
10.1.2	Anhang A2: Darstellung erhaltener Sequenzen aus Sanger- und Parallelsequenzierung	213
10.2	Anhang B: Abbildungen	246
10.2.1	Anhang B1: DNA-Extraktionsverfahren	246
10.2.2	Anhang B2: DNA-Aufreinigungsverfahren	249
10.2.3	Anhang B3: Next Generation Sequencing	252
10.2.4	Anhang B4: Detektion von amplifizierter DNA mittels Agarosegelelektrophorese	260
11	Danksagung	267
12	Erklärung	269
13	Curriculum Vitae	270

I Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	CFU	Colony Forming Units (engl., koloniebildende Einheiten)
°C	Grad Celsius	<i>Cl.</i>	<i>Cladosporium</i>
λ	Lambda	CO1	mitochondriale Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1
<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>	COPD	Chronic obstructive pulmonary disease (engl., Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung)
Abb.	Abbildung	<i>Cr.</i>	<i>Cryptococcus</i>
AgNO ₃	Silbernitrat	CTAB	Cetyltrimethylammonium- bromid
<i>Al.</i>	<i>Alternaria</i>	<i>D.</i>	<i>Didymella</i>
APS	Ammoniumpersulfat	<i>De.</i>	<i>Dermanyssus</i>
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Ana- lysis (engl., Automati- sierte Ribosomale Intergenic Spacer Ana- lyse)	DG18	Dichlor-Glycerin-Agar
<i>Au.</i>	<i>Aureobasidium</i>	DGGE	Denaturierende- Gradienten- Gelelektrophorese
a _w	Wasseraktivität, verfügbares Wasser in einem Material	d.h.	das heißt
BAL	Broncheoalveoläre Lavage	<i>Di.</i>	<i>Dioszegia</i>
bidest.	bidestilliertes Wasser	DNA	Desoxyribonucleic acid, (engl. Desoxyribonuklein- säure)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphat
<i>Bo.</i>	<i>Botryotinia</i>	dsDNA	doppelsträngige DNA
bp	Basenpaar	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>Bu.</i>	<i>Bullera</i>	<i>E.</i>	<i>Epicoccum</i>
bzw.	beziehungsweise	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>C.</i>	<i>Candida</i>	emPCR	Emulsions-PCR (s.a. PCR)
ca.	circa	EPA	Environmental Protection Agency (engl., Umwelt- schutzbehörde)
Ca ²⁺	Calcium-Ionen		
CBS- KNAW	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Institut der Königlich-Nieder- ländischen Akademie für Kunst und Wissen- schaften		

EPS	Exopolysaccharid	L	Liter
ERMI	Environmental Relative Moldiness Index (engl., Index zur Beurteilung des Schimmelbefalls)	<i>L.</i>	<i>Leptosphaerulina</i>
et al.	et alteri (lat., und andere)	LDH	Laktatdehydrogenase
<i>Eu.</i>	<i>Eurotium</i>	LFL	Landesanstalt für Landwirtschaft
<i>Ex.</i>	<i>Exophiala</i>	LSU	large-subunit (engl., große Untereinheit)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	m, μ	milli-, mikro-
g	Gramm	M	Molar
<i>G.</i>	<i>Glyphium</i>	MDE	Mutation Detection Enhancement
<i>Ga.</i>	<i>Galactomyces</i>	MID	Multiplex Identifier
GABRIEL	Multidisziplinäre Studie zur Identifikation der genetischen und umweltbeeinflussten Ursachen für Asthma in der Europäischen Gemeinschaft	min	Minute
GLB	Gel-Loading-Buffer (engl., Gelladungspuffer)	MSQPCR	Mold-specific qPCR, (engl., Schimmelpilz-spezifische, quantitative PCR)
Gy	Gray (pro Masse absorbierte Energie; [J/kg])	MVOC	Microbial, volatile, organic compound (engl., mikrobielle, volatile, organische Komponenten)
h	Stunde	NaCl	Natriumchlorid
HCl	Chlorwasserstoff	Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
H ₂ O	Wasser	NaOH	Natriumhydroxid
ICBN	Internationaler Code der botanischen Nomenklatur	NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ig	Immunglobulin, z.B. IgA, IgE, IgG	n	Nano-
IGS	Intergenic spacer	NGS	Next Generation Sequencing
IL	Interleukin	nt	Nukleotid
ITS	Internal transcribed spacer	ODTS	Organic dust toxic syndrome (engl., toxisches Syndrom, ausgelöst durch Kontakt mit organischem Staub)
k	kilo-	OR	Odds ratio (engl. Kreuzproduktverhältnis)
Kat.-	Katalognummer	OTU	Operating Taxonomic Unit
kb	Kilo-Basen	p	piko-
kDa	kilo-Dalton		

<i>P.</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Sy.</i>	<i>Sydowia</i>
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (engl., Polymerase-Ketten-Reaktion)	<i>T.</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Ph.</i>	<i>Phoma</i>	Tab.	Tabelle
<i>Pi.</i>	<i>Pichia</i>	TBE	Tris-Borsäure-Puffer mit EDTA
<i>Ps.</i>	<i>Pseudotaeniolina</i>	TE	Tris-EDTA-Lösung
PTP	PicoTiterPlate™	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
qPCR	quantitative PCR	TGGE	Temperaturgradient-Gelelektrophorese
rDNA	ribosomale DNA	TNF	Tumornekrosefaktor
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus	T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RISA	Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (engl., Ribosomale Intergenic Spacer Analyse)	tRNA	Transfer-RNA
rpm	rounds per minute (engl., Umdrehungen pro Minute)	TUM	Technische Universität München
RT	Raumtemperatur	U	Unit (engl., Enzymeinheit)
s	Sekunde	u.a.	unter anderem
s.	siehe	UK	Unterklasse
s.a.	siehe auch	usw.	und so weiter
SD	Standardabweichung	uvm.	und viele mehr
SDS	Natriumdodecylsulfat	V	Volt
s.o.	siehe oben	v.a.	vor allem
sp./spp.	Spezies (Einzahl/Mehrzahl)	<i>W.</i>	<i>Wallemia</i>
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism (engl., Einzelstrang-Konformationspolymorphismus)	WHO	World Health Organization (engl., Weltgesundheitsorganisation)
ssDNA	single-stranded DNA (engl., einzelsträngige DNA)	WHS	World Health Survey (engl., Weltgesundheitsstudie)
		z.B.	zum Beispiel
		z.T.	zum Teil

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systematische Klassifizierung der Pilze nach HIBBETT ET AL. (2007) unter besonderer Berücksichtigung der, für diese Studie wichtigen, Mikromyzeten im Unterreich der Dikarya	5
Tabelle 2: Liste der am häufigsten in abgesetztem Staub nachweisbaren Pilzspezies unter besonderer Berücksichtigung der häufigsten Vertreter in Matratzenstaub (BEGUIN, 1995; BEGUIN UND NOLARD, 1996; FLANNIGAN UND MILLER, 2001).....	8
Tabelle 3: Sekundärmetabolite häufiger Innenraum-assoziiertes Schimmelpilze nach JARVIS UND MILLER (2004).....	11
Tabelle 4: Zur Methodenentwicklung und -validierung eingesetzte Pilzarten	31
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten, technischen Geräte	34
Tabelle 6: Übersicht über das verwendete Verbrauchsmaterial	36
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	37
Tabelle 8: Angewandte DNA-Extraktionsverfahren	45
Tabelle 9: Reagenzien pro PCR-Ansatz.....	46
Tabelle 10: Reagenzien für λ -Exonuklease-Verdau pro Ansatz	47
Tabelle 11: Ausgewählte Primerkombinationen.....	52
Tabelle 12: PCR-Protokolle für die Amplifikation Pilz-spezifischer DNA.....	53
Tabelle 13: Amplifikatlänge und SSCP-Bedingungen in Abhängigkeit des Primer-paares.....	54
Tabelle 14: Notensystem zur objektiven Evaluierung von universellen Pilz-Primern	56
Tabelle 15: Beobachtungswerte des Rangfolgetests zur Bestimmung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens für Pilze aus Staubproben.....	58
Tabelle 16: Liste der überprüften Parameter-Einstellungen für die GelCompar® II Band-matching-Anwendung.....	64
Tabelle 17: Ausgewählte speziesspezifische Primer für <i>Penicillium</i> spp. und <i>Exophiala</i> spp.	67

Tabelle 18: PCR Bedingungen für speziesspezifische Primer für <i>Penicillium</i> spp. und <i>Exophiala</i> spp.	67
Tabelle 19: Übersicht über die DNA-Amplifikation von 38 Pilzspezies mit sechs universellen, Pilz-spezifischen Primerpaaren	70
Tabelle 20: Ergebnisse der Evaluierung der angewandten Primerpaare.....	75
Tabelle 21: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von DNA-Amplifikaten von fünf Pilzarten nach Auswahl von sechs Primerpaaren.....	76
Tabelle 22: Ergebnis des Rangfolgetests zur Bestimmung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens	79
Tabelle 23: Reproduzierbarkeitswerte (Ähnlichkeiten der SSCP-Bandenprofile) von Staubproben unterschiedlicher Herkunft (Pearson Korrelations-Koeffizient (%)).	84
Tabelle 24: Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen der Stall- und Hausstaubproben im Vergleich zu den PCR-SSCP-Ergebnissen.....	89
Tabelle 25: Vergleich der dominanten Spezies bei der Parallelsequenzierung (GS Junior, ROCHE) von nativen DNA-Extrakten und PCR-Amplifikaten (570-590 bp Fragment) unterschiedlicher Herkunft.....	92
Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Stall- und Hausstaubproben mittels PCR-SSCP, Parallelsequenzierung und Kultur.	93
Tabelle 27: Gelpositionen mit signifikanter, positiver oder inverser Assoziation mit Asthma (Densitometrie)	98
Tabelle 28: Schnittmengen der dichotomisierten und kontinuierlichen Analysevarianten (Densitometrie).....	98
Tabelle 29: Ausgewählte Softwareeinstellungsvarianten für die Auswertung der Banden-information mittels Bandmatching (Software GelCompar® II) ...	99
Tabelle 30: Mit Asthma assoziierte, signifikante Banden bei Auswertung der dichotomisierten Werte mit Cut-off 5 (Bandmatching).....	100
Tabelle 31: Mit Asthma assoziierte, signifikante Banden bei Auswertung der dichotomisierten Werte mit Cut-off 10 (Bandmatching)	100

Tabelle 32: Mit Asthma assoziierte, signifikante Banden bei Auswertung der logarithmierten Werte und kontinuierlichen Verwendung der Variablen (Bandmatching)	100
Tabelle 33: Schnittmenge der dichotomisierten und kontinuierlichen Analysevarianten (Bandmatching)	101
Tabelle 34: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach densitometrischer Auswertung der Bandeninformation.....	103
Tabelle 35: Amplifikation von Proben der Gelposition 621/627 mit spezies-spezifischen Primerpaaren von <i>Exophiala</i> spp. und <i>Penicillium</i> spp. ...	109
Tabelle 36: Vergleich der Sanger-Sequenz von Probe 2 der Gelposition 621/627 (<i>Exophiala</i> sp.; EU035420.1) mit Datenbank-Referenzsequenzen (NCBI-BLAST) von vier <i>Exophiala</i> spp.	110
Tabelle 37: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach Auswertung der Bandenklassen der Bandmatching-Analyse	112
Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden	116
Tabelle 39: Ergebnisse der Untersuchung der Pilzdiversität in Matratzenstaubproben von Schulkindern mittels Parallelsequenzierung.....	125
Tabelle 40: Mit Asthma assoziierte, signifikante OTU-Sequenzen nach Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben unterschiedlicher Herkunft	126
Tabelle 41: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Hühnerstall) innerhalb eines Polyacrylamidgels (Intragel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)	207
Tabelle 42: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Schweinstall) innerhalb eines Polyacrylamidgels (Intragel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5).....	208
Tabelle 43: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Kuhstall) innerhalb eines Polyacrylamidgels (Intragel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5).....	208

Tabelle 44: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Matratze) innerhalb eines Polyacrylamidgels (Intragel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)	209
Tabelle 45: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Schweine-stall) zwischen Polyacrylamidgelen (Intergel-Variation; Pearson Korre-lations-Koeffizient (%); n = 4)	210
Tabelle 46: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Kuhstall) zwischen Polyacrylamidgelen (Intergel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)	211
Tabelle 47: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Matratze) zwischen Polyacrylamidgelen (Intergel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)	211
Tabelle 48: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Hühnerstall) von verschiedenen DNA-Extraktionstagen auf einem Polyacrylamidgel (Intertag-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)	212
Tabelle 49: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Schweine-stall) von verschiedenen DNA-Extraktionstagen auf einem Polyacryl-amidgel (Intertag-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)	212
Tabelle 50: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm <i>Aspergillus versicolor</i> (DSM 1943) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren	213
Tabelle 51: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm <i>Cladosporium herbarum</i> (DSM 63422) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren	214
Tabelle 52: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm <i>Eurotium amstelodami</i> (DSM 62629) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren	216
Tabelle 53: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm <i>Penicillium chrysogenum</i> (DSM 844) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren	217

Tabelle 54: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm <i>Wallemia sebi</i> (DSM 5329) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren	219
Tabelle 55: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel.....	221
Tabelle 56: Erhaltene Sequenzinformationen der Parallelsequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel – Darstellung der drei häufigsten OTU-Sequenzen je Probenquelle.....	224
Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation	228
Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation	238

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Pilzzellwand (HAASE, 2009B).....	20
Abbildung 2: Darstellung der ribosomalen DNA der Pilze mit den Zielregionen der eingesetzten Primer	23
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR-SSCP-Analyse.....	26
Abbildung 4: Darstellung des Ablaufs der 454 Pyrosequenzierung von spezifischen Amplikons; nach MARDIS (2008) mit leichten Modifikationen.....	28
Abbildung 5: Übersicht des Hintergrunds der GABRIEL-Matratzenstaubproben bezüglich Quelle und Gesundheitsstatus der Schulkinder	34
Abbildung 6: Arbeitsschritte der validierten PCR-SSCP-Methode	61
Abbildung 7: Darstellung von PCR-Amplifikaten unterschiedlicher Pilzarten; Vergleich von sechs universellen, Pilz-spezifischen Primerpaaren	69
Abbildung 8: PCR-SSCP-Analyse von sieben Pilzarten: Trennung der „Einzelstränge“ im Polyacrylamidgel nach Anwendung von sechs universellen, Pilz-spezifischen Primerpaaren	73
Abbildung 9: Bestimmung des Detektionslimits der PCR-SSCP Methode.....	80
Abbildung 10: PCR-SSCP-Analyse von zehn DSMZ-Referenzstämmen	81
Abbildung 11: Pilzspeziesstandard („Spec“) für die PCR-SSCP-Analyse (Normalisierung).....	82
Abbildung 12: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der PCR-SSCP-Analysemethode	83
Abbildung 13: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der PCR-SSCP-Ergebnisse anhand Pearson-Cluster-Analyse (Probenmaterial Schweinestallstaub)	85
Abbildung 14: PCR-SSCP-Analyse von Stall- und Matratzenstaubproben zum Nachweis der Funktionalität der Methode.....	88
Abbildung 15: Vergleichsanalyse von nativem DNA-Extrakt und PCR-Amplifikat (570-590 bp Fragment) mittels Parallelsequenzierung (GS Junior, ROCHE)	90

Abbildung 16: Parallelsequenzierung (GS Junior, ROCHE) von nativen DNA-Extrakten und PCR-Amplifikaten (570-590 bp) unterschiedlicher Herkunft im Vergleich.....	91
Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung eines Polyacrylamidgels der PCR-SSCP-Analyse von 17 Matratzenstaubproben (GABRIEL).....	95
Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der densitometrischen Werte von sechs Bandenprofilen aus Abbildung 17	95
Abbildung 19: Assoziationen von Gelpositionen mit Asthma/asthmatischer Bronchitis (Densitometrie)	97
Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung der ausgewählten, signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen/Banden	102
Abbildung 21: Wiederholung der PCR-SSCP-Analyse ausgewählter Banden der Gelposition 621/627 mit veränderten Trennbedingungen gegenüber dem Standardverfahren (MDE-Konzentration: 35 %; Laufzeit: 32 h).....	107
Abbildung 22: DNA-Extraktion mit PowerSoil™ Isolation Kit (MOBIO).....	246
Abbildung 23: DNA-Extraktion mit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA).....	247
Abbildung 24: DNA-Extraktion mit CTAB nach KORTHALS ET AL. (2008A) mit Modifikationen	248
Abbildung 25: Aufreinigung von PCR-Produkten mit GenElute™ PCR Clean-up Kit (SIGMA).....	249
Abbildung 26: Aufreinigung von einzelsträngiger DNA mit GenElute™ PCR Clean-up Kit (SIGMA).....	250
Abbildung 27: Aufreinigung von einzelsträngiger DNA aus einem Polyacrylamidgel durch „Crush & Soak“ (PETERS ET AL., 2000).....	250
Abbildung 28: Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel mit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)	251
Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplification und Sequencing	252

- Abbildung 30: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation von Pilzreinkulturen aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Tierhygiene mit den Primerpaaren (A) 0817/1536, (B) NS7/NS8, (C) U1/U2, (D) ITS1/ITS4, (E) ITS1F/ITS4 und (F) Fun18sf/ITS4 260
- Abbildung 31: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation von (A) Total-DNA-Extrakten aus Matratzenstaubproben mit Power Soil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) und (B) vorselektierten DNA-Proben nach Gelextraktion mit Primerpaar ITS1/ITS4 261
- Abbildung 32: Amplifikation des vorselektierten 570-590 bp Fragments (oben) und der Crush & Soak-Proben (unten) von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar PchryF4-1/PchryR8 262
- Abbildung 33: Amplifikation des vorselektierten 570-590 bp Fragments (oben) und der Crush & Soak-Proben (unten) von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar PchryF1/PauraR1 263
- Abbildung 34: Amplifikation der Crush & Soak-Proben von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar ExdF/ExdR 264
- Abbildung 35: Amplifikation des vorselektierten 570-590 bp Fragments (a) und des nativen DNA-Extrakts (b) von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar ExdF/ExdR 265
- Abbildung 36: Amplifikation des nativen DNA-Extrakts von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar E1m/E2 266

1 Einleitung

Pilze sind eukaryotische Lebewesen, die als Mikro- (z.B. Hefen, Schimmelpilze) und Makromyzeten (z.B. Speisepilze) ubiquitär auf der Welt verbreitet sind. Mutmaßlich gibt es über eine Million verschiedene Arten, wovon bislang allerdings nur etwa 150.000 identifiziert wurden. Durch die intensive Anwendung molekulargenetischer Verfahren steigt die Anzahl identifizierter Arten allerdings fortlaufend an (HAASE, 2009A). Der Fokus dieser Studie lag auf den artifiziellen Gruppen „Hefen“ und „Schimmelpilze“; artifiziell aus dem Grund, da die Bezeichnungen keine Artdefinitionen im herkömmlichen Sinn darstellen, sondern morphologisch ähnliche Pilze, mit jedoch zum Teil deutlich unterschiedlicher Phylogenie, beschreiben. Vertreter dieser Gruppen werden häufig in der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie zur Herstellung von Genuss- und Arzneimitteln eingesetzt; allerdings gelten viele auch als obligate oder opportunistische Krankheitserreger beim Menschen (HAASE, 2009A UND B; KÜCK ET AL., 2009). Zum einen können sie dermale und toxische Erkrankungen verursachen; zum anderen sind sie für die Entstehung von Krankheiten des respiratorischen Systems wie die chronisch obstruktive pulmonäre Erkrankung (engl. chronic obstructive pulmonary disease, COPD) und Heuschnupfen verantwortlich (DAY UND ELLIS, 2001; LINNACKER UND SMEDLEY, 2002; RADON ET AL., 2004; SINGH UND SCHWARTZ, 2005; RADON ET AL., 2006). Da Pilzwachstum im Haus zudem in der Regel mit Feuchtigkeit assoziiert ist, kann die dadurch bedingte starke Exposition mit Pilzsporen und Mykotoxinen zur Entwicklung von allergischem Asthma beitragen (MENDELL ET AL., 2011).

Der Nachweis der Pilzexposition erfolgt häufig auf kultureller Basis. Generell wird jedoch geschätzt, dass lediglich < 1 bis 79 % der mikrobiellen Biomasse mit kultur-basierten Methoden nachgewiesen werden können (TOIVOLA ET AL., 2004; NIEMEIER ET AL., 2006). Die kulturelle Bestimmung ist auf diejenigen Genera/Spezies beschränkt, die anzüchtbar sind (AMANN ET AL., 1995; THORN, 1997; DOUWES ET AL., 1999; VAN ELSAS ET AL., 2000; MEKLIN ET AL., 2004; LIGNELL ET AL., 2008). Darüber hinaus können meist nur diejenigen Pilze in hoch-diversen Proben wie zum Beispiel Staub identifiziert werden, die sich aufgrund hoher Wachstumsraten und dominantem Vorkommen in der Probe gegenüber ihren Konkurrenten durchsetzen können (DIX UND WEBSTER, 1995; MACNEIL ET AL., 1995; HUGENHOLTZ UND PACE, 1996). Damit wird die Ermittlung der tatsächlichen Pilzdiversität erschwert sowie die Wahrscheinlichkeit

erhöht, dass potenzielle Pathogene in einer Probe unentdeckt bleiben (HIRVONEN ET AL., 1997; KAUFFMAN UND VAN DER HEIDE, 2003).

Im Rahmen dieser Studie sollte deshalb die Pilzdiversität im ländlichen Umfeld sowie die Pilzexposition der dort lebenden Personen mit Hilfe kulturunabhängiger Verfahren, welche auch eine Identifizierung von nur schwer oder bisher nicht-kultivierbaren Vertretern zulassen (KIRK ET AL., 2004; YAMAMOTO ET AL., 2011; SHENDELL ET AL., 2012), ermittelt werden. Die dabei angewandten Methoden zeigten sich bereits in vorherigen Studien als geeignet (KORTHALS ET AL., 2008B; KORTHALS, 2009; EGE ET AL., 2011; PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012). Das Probenmaterial Staub ist ein Reservoir für Pilzsporen (VAN BRONSWIJK, 1981) und der Transfer von Sporen durch den Menschen aus dem Stall ins Haus konnte nachgewiesen werden (VOGEL ET AL., 2008). Aus diesem Grund wurde es für die vorliegende Studie ausgewählt.

Zur Erfassung der Diversität von Pilzgemeinschaften in der Matrix Staub wurde zunächst die Optimierung, Evaluierung und Validierung der beiden kulturunabhängigen Methoden PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphismus) und Parallelsequenzierung (454 Pyrosequenzierung) durchgeführt. Die etablierten Verfahren sollten im Anschluss beispielhaft Anwendung bei der Diversitätsbestimmung in Stall- und Hausstaubproben finden. Darüber hinaus sollte eine molekular-epidemiologische Untersuchung zur Erfassung potenziell asthma- und atopiepräventiver Pilze im bäuerlichen Milieu erfolgen. Hierbei sollte festgestellt werden, ob Bauernhof- und Landkinder (Kinder aus derselben ländlichen Region ohne Bauernhofkontakt), jeweils mit und ohne ärztlich diagnostiziertem, allergischem Asthma, einer unterschiedlichen Pilzexposition ausgesetzt waren. Die Feststellung dieser Unterschiede wurde durch den Vergleich der PCR-SSCP-Bandenprofile von 844 Matratzenstaubproben und der signifikant mit Asthma assoziierten Sequenzen bei 60 davon ausgewählten Proben bei der Parallelsequenzierung erreicht.

2 Literaturübersicht

2.1 Pilze

2.1.1 Biologie und systematische Klassifizierung

Das Reich der Pilze (lat. fungus) ist eigenständig innerhalb der Eukaryonten, deren Zellen jeweils Mitochondrien und ein Zytoskelett enthalten, und umfasst sowohl Einzeller (Hefen; z.B. Abteilung Ascomycota, Unterabteilung Saccharomycotina) als auch Vielzeller. Diese sind in weiteren Unterabteilungen der Ascomycota (Schlauchpilze, z.B. Unterabteilung Pezizomycotina) als auch bei den Basidiomycota (Ständerpilze) sowie bei außerhalb der Dikarya stehenden Unterabteilungen wie z.B. den Mucormycotina vertreten (Tabelle 1). Die Abspaltung der Pilze von den weiteren Eukarya – Pflanzen und Tiere – erfolgte vor ca. 1 Milliarde Jahre. Aufgrund ihres Speicherstoffs Glykogen sind sie phylogenetisch näher mit den Tieren als mit den Pflanzen (Speicherstoff: Stärke) verwandt (HAASE, 2009A). Pilze sind generell heterotroph und leben dabei entweder saprophytisch oder parasitisch. Die Vermehrung erfolgt entweder geschlechtlich (sexuell) durch Gametenkonjugation mit nachfolgender Meiose (teleomorphe Lebensformen) oder vegetativ über Mitosporen (anamorphe Lebensformen), was in den meisten Fällen den größeren Teil des Lebenszyklus betrifft. Vor allem die mikrobiologisch-klinisch relevanten Spezies – sowohl Hefen als auch Schimmelpilze aus den oben genannten Gattungen der vielzelligen Pilze – vermehren sich hauptsächlich ungeschlechtlich. Zahlreiche Arten sind bisher als Verursacher von Mykoallergosen (allergische Reaktionen auf inhalierte oder ingerierte Pilzbestandteile), Mykotoxikosen (chronische Schädigungen durch Kontakt mit Mykotoxinen) und Mykosen (Ausbildung von Pilzmyzel im Wirt mit zum Teil systemisch verlaufenden Erkrankungen) bekannt. Zudem gelten weitere 300 Arten als opportunistische Erreger bei immuninkompetenten Patienten. Auf der anderen Seite finden Mikromyzeten eine weitverbreitete Anwendung bei der biotechnologischen Herstellung von Vitaminen wie Hefeextrakte und pharmakologisch wirksamen Stoffen wie Penicillin. Außerdem kommen sie in der Lebensmittelindustrie, wie *Saccharomyces cerevisiae* bei der alkoholischen Gärung, *Botrytis cinerea* bei der Trockenbeerenauslese der Weinherstellung oder verschiedene *Penicillium* spp. als Edelschimmelpilze bei der Käseherstellung, zum Einsatz (HAASE, 2009A UND 2009B; KÜCK ET AL., 2009).

Die systematische Klassifizierung der Pilze ist ein anhaltender Prozess und wurde mit dem Beginn der Analyse der ribosomalen RNA-Gene Anfang der 1990er Jahre revolutioniert und vereinfacht (WHITE ET AL., 1990). Durch den methodischen Fortschritt, v.a. hinsichtlich neuer und schnellerer Sequenzierungstechnologien, erhöhte sich die Publikationsrate phylogenetischer Studien, sodass allein in den Jahren 2002 bis 2006 weit über 360 Artikel diesbezüglich veröffentlicht wurden. Damit waren in kürzester Zeit kurz zuvor erschienene Veröffentlichungen wie „Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi“ (KIRK ET AL., 2001) und „The Mycota VII“ (MCLAUGHLIN ET AL., 2001A UND 2001B) bereits nicht mehr aktuell. Allein in diesen fünf Jahren wurden außerdem ca. 80 % der bis 2007 in den Datenbanken vorhandenen rRNA-Gensequenzen der Pilze hinterlegt (HIBBETT ET AL., 2007). Dieser schnelle Zuwachs an Informationen führte jedoch zu Schwierigkeiten hinsichtlich einer einheitlichen Benennung der systematischen Gruppen. Während die neunte Version des „Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi“ (KIRK ET AL., 2001) *Basidiomyceten* als Klasse der Abteilung Basidiomycota ausgab, wurden diese in der Genbank von NCBI als *Hymenomyceten* bezeichnet. Ebenso wurden *Ascomyceten* in Myconet als *Pezizomycotina* geführt. (HIBBETT ET AL., 2007). Aus diesem Grund erarbeiteten 67 Wissenschaftler im Rahmen des Projekts „Assembling the Fungal Tree of Life“ eine neue und in Zukunft anzuwendende Einteilung aller Pilztaxa bis auf Ordnungsebene, die diese uneinheitlichen Bezeichnungen beseitigte (HIBBETT ET AL., 2007). Tabelle 1 zeigt diese systematische Klassifizierung mit Hauptaugenmerk auf diejenigen Ordnungen der Mikromyzeten, die in dieser Studie eine Rolle spielten. Eine tiefergehende Einteilung auf Familien- bzw. Speziesebene war zu diesem Zeitpunkt aufgrund des, bis dahin vorgegebenen „Internationalen Codes der botanischen Nomenklatur (ICBN)“ (MCNEILL ET AL., 2006), nicht möglich. Häufig ist ein und derselbe Pilz hinsichtlich seiner anamorphen und teleomorphen Lebensform unterschiedlich benannt, wie z.B. *Eurotium* spp., welche die Hauptfruchtformen (sexuell) der sich vegetativ vermehrenden Formen der *Aspergillus glaucus* Gruppe darstellen. HAWKSWORTH ET AL. (2011) gaben schließlich eine Erklärung für die Nomenklatur der Pilze ab, welche einem Pilz einen Namen zuteilte. So soll eine Pilzspezies im ICBN, unabhängig von der Vermehrungsart, hinsichtlich des zuerst veröffentlichten Namens oder, in Ausnahmefällen, mit dem gebräuchlicheren Namen benannt werden.

Tabelle 1: Systematische Klassifizierung der Pilze nach HIBBETT ET AL. (2007) unter besonderer Berücksichtigung der, für diese Studie wichtigen, Mikromyzen im Unterreich der Dikarya

Unterreich	Abteilung	Unterabteilung	Klasse	Ordnung			
Dikarya	Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales, z.B. Saccharomyces, Candida, Galactomyces, Pichia			
			Dothideomycetes	<u>UK: Dothideomycetidae</u> Capnodiales, z.B. Mycosphaerella, Septoria, Cladosporium, Pseudotaeniolina Dothideales, z.B. Aureobasidium, Sydowia <u>UK: Pleosporomycetidae</u> Pleosporales, z.B. Alternaria, Didymella, Leptosphaeria, Epicoccum Leptosphaerulina, Phoma			
		Eurotiomycetes	Eurotiomycetes	<u>UK: Chaethothyriomycetidae</u> Chaethothyriales, z.B. Exophiala Verrucariales, z.B. Verrucaria <u>UK: Eurotiomycetidae</u> Eurotiales; z.B. Penicillium, Aspergillus, Eurotium			
				Lecanaromycetes	<u>incertae sedis</u> ; Candelariales, z.B. Candelaria		
				Leotiomycetes	Helotiales, z.B. Botrytis		
				Sodariomycetes	<u>UK: Hypocreomycetidae</u> Hypocreales, z.B. Acremonium, Fusarium, Stachybotrys <u>UK: Xylariomycetidae</u> Xylariales, z.B. Microdochium		
				Basidiomycota	Agaricomycotina	Tremellomycetes	Tremellales, z.B. Cryptococcus, Trichosporon
					<i>incertae sedis</i>	Wallemiomycetes	Wallemiales, z.B. Wallemia
				-	<i>incertae sedis</i>	Mucormycotina	Mucorales, z.B. Mucor, Rhizopus

UK: Unterklasse; *incertae sedis*: nicht genau zugeordnet; beispielhafte Spezies fett gedruckt

Der Fokus dieser Studie lag auf der Untersuchung der Diversität an Hefen und Schimmelpilzen in Stall- und Hausstaubproben. Aus diesem Grund sollen diese Teilgruppen des Reichs Pilze im Weiteren hinsichtlich ihrer Verbreitung und medizinischen Bedeutung näher beleuchtet werden. Die im Sprachgebrauch weit verbreiteten Gruppennamen „Hefen“ und „Schimmelpilze“ stellen hierbei allerdings keine Begriffe

im klassischen Sinne einer Artdefinition dar, sondern werden lediglich artifiziell für morphologisch ähnliche Pilze, mit jedoch zum Teil deutlich unterschiedlicher Phylogenie verwendet. Der Begriff „Schimmelpilz“ umfasst dabei eine Gruppe von Pilzen, v.a. Ascomycota, die folgende Kriterien erfüllen: Bildung asexueller Sporen, saprophytische Lebensweise, ubiquitäres Vorkommen, filamentöse Myzelien, artspezifische Sekundärmetabolismen und hohe Wachstumsgeschwindigkeiten ihrer v.a. vegetativ gebildeten Myzelien (KÜCK ET AL., 2009). Auch die Hefen stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, die alle nicht-melanisierten, einzelligen Pilze mit einem Durchmesser von 3-5 µm umfasst. Man unterscheidet insgesamt fünf Gruppen an Pilzen, bei denen hefeartig wachsende Vertreter vorkommen (s.a. Tabelle 1; HAASE, 2009c): (a) askomyzetale Hefen (z.B. *Candida*, *Saccharomyces*), die teilweise eine Pseudomyzel ausbilden, (b) Endomycetales (z.B. *Geotrichum*), die häufig aus Milchprodukten und dem Respirationstrakt isoliert werden können und sich durch Arthrokonidienbildung vermehren, (c) Pneumocystis (z.B. *Schizosaccharomyces*) mit medianer Spaltung oder nur polarem Wachstum (sehr isolierte Gruppe), (d) Phaeohyphomyzeten („schwarze Hefen“); vornehmlich aus den Klassen Dothideomyzeten (z.B. *Aureobasidium*, *Cladosporium*) und Eurotiomyzeten (z.B. *Exophiala*), aufgrund der Ausbildung eines Luftmyzels mit Konidiophoren keine direkte Zuordnung zu den Hefen, (e) Basidiomyzeten (z.B. *Cryptococcus*, *Trichosporon*), die neben Arthrokonidien auch Blastokonidien bilden können.

2.1.2 Pilze in der Umwelt

Schimmelpilze und Hefen kommen auf allen Kontinenten und dabei auch an extremen Standorten wie der Antarktis, z.B. *Cryptococcus victoriae* (MONTES ET AL., 1999), vor. Die Diversität scheint dabei jedoch in gemäßigten Klimazonen höher zu sein als in tropischen (AMEND ET AL., 2010B); *Aspergillus*-Arten scheinen wärmere Gebiete zu bevorzugen als *Penicillium* und *Fusarium* (KÜCK ET AL., 2009). Die Verbreitung erfolgt bei sporenbildenden Arten in der Regel über den Luftweg, wobei die Parameter Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Sonneneinstrahlung und Luftbewegung hierfür entscheidend sind (KÜCK ET AL., 2009). Nachzuweisen sind Pilze dabei u.a. in Luftproben, in Staubproben, im Erdboden, im Wasser, auf verwitterndem Holz, verdorbenen Lebensmitteln sowie auf diversen Materialien im Haus in Verbindung mit Feuchtigkeit (BEGUIN, 1995; BEGUIN UND NOLARD, 1996; FLANNIGAN UND MILLER, 2001; WANG ET AL., 2001; HAASE ET AL., 2009A; KÜCK ET AL., 2009; AMEND ET AL., 2010B; PITKÄRANTA ET AL.,

2011; BIEDUNKWIEWICZ UND SCHULZ, 2012; RINTALA ET AL., 2012). Zudem spielen sie eine entscheidende Rolle als Pflanzenpathogene und verursachen dabei Quantitäts- und Qualitätsverluste (PAUL, 1983; SMILEY ET AL., 1992; LEROUX ET AL., 1999; SIMPSON ET AL., 2000; TÓTH ET AL., 2007). Die häufigsten Genera in der Außen- und Innenraumluft sowie in abgesetzten Staubproben (z.B. Teppich, Matratze) sind in absteigender Reihenfolge *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* und *Leptosphaeria* (BEGUIN, 1994; BEGUIN UND NOLARD, 1996; LI UND HSU, 1997; FLANNIGAN, 2001; MULLINS, 2001). Die vier Erstgenannten machen dabei in etwa 90 % (FISCHER UND DOTT, 2003), *Aspergillus/Penicillium* 2-10 % der Sporen in der Außenluft aus (LACEY, 1996; MULLINS, 2001). Im Innenraum dominieren in der Regel *Aspergillus* und *Penicillium* (BEGUIN, 1994; BEGUIN UND NOLARD, 1996; KAARAKAINEN ET AL., 2009; PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012; RINTALA ET AL., 2012). Aufgrund saisonaler Schwankungen kann hier allerdings auch *Cladosporium* dominant vorliegen, da dieses Genus zusammen mit *Alternaria* in den Sommermonaten während der Erntezeit die höchsten Konzentrationen aufweist (REN ET AL., 1999; FLANNIGAN, 2001). Die Sporenkonzentrationen von *Aspergillus* und *Penicillium* unterliegen keinen saisonalen Schwankungen (ANDERSON, 1985). Im Innenraum sind die höchsten Konzentrationen im Bereich des Schlafzimmers und in Teppichen sowie auch in Kleidungsstücken, verrotteten Möbeln und bei Zimmerpflanzen zu finden (KÜCK ET AL., 2009). Im Vergleich verschiedener Häuser variiert die messbare Konzentration an Pilzsporen jedoch stark und liegt zwischen 10^0 und 10^8 CFU/g bei verschiedenen Gebäudematerialien (HYVÄRINEN ET AL., 2002) sowie im Mittel bei ca. 10^5 CFU/g in Staubproben (MILLER ET AL., 1988). In der vorliegenden Studie wurde abgesetzter Staub untersucht, deshalb sind in Tabelle 2 die am häufigsten in dieser Matrix enthaltenen Pilzspezies nach BEGUIN (1995), BEGUIN UND NOLARD (1996) sowie FLANNIGAN UND MILLER (2001) aufgelistet.

Tabelle 2: Liste der am häufigsten in abgesetztem Staub nachweisbaren Pilzspezies unter besonderer Berücksichtigung der häufigsten Vertreter in Matratzenstaub (BEGUIN, 1995; BEGUIN UND NOLARD, 1996; FLANNIGAN UND MILLER, 2001)

Gewöhnlich vorkommend	Häufig vorkommend	Gering vorkommend
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Absidia corymbifera</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus penicilloides</i>	<i>Aspergillus candidus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus restrictus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aspergillus tamarii</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Chaetomium</i> spp.	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>Epicoccum purpurascens</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Eurotium herbariorum</i>	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	<i>Emericella nidulans</i>
<i>Eurotium repens</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Eurotium amstelodami</i>
<i>Mucor</i> spp.	<i>Penicillium griseofulvum</i>	<i>Eurotium chevalieri</i>
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Penicillium citreonigrum</i>	<i>Exophiala jeanselmei</i>
<i>Penicillium brevicompactum</i>	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
<i>Penicillium commune</i>	<i>Ulocladium botrytis</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Ulocladium chartarum</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>
<i>Penicillium spinulosum</i>		<i>Penicillium crustosum</i>
<i>Phoma</i> spp.		<i>Penicillium echinulatum</i>
<i>Phoma herbarum</i>		<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Rhizopus stolonifer</i>		<i>Verticillium dahliae</i>
<i>Trichoderma</i> spp.		
<i>Wallemia sebi</i>		

2.1.3 Pilze als Humanpathogene

2.1.3.1 Mykosen

Als obligat pathogen wirkende Pilze gelten die sogenannten Dermatophyten („Hautpilze“; z.B. *Trichophyton rubrum*), die oberflächlich Fuß- und Nagelpilzkrankungen wie Tinea pedis verursachen. Darüber hinaus sind jedoch auch zahlreiche Hefen und Schimmelpilze als fakultative Pathogene bekannt. Bei immunsupprimierten Patienten können sie jedoch zu schwerwiegenden, systemischen Mykosen führen, wobei durch die nasale Aufnahme der Sporen v.a. das Atemsystem der primäre Infektionsherd ist. Von dort kann sich die Infektion auf das Blut und/oder Lymphsystem ausbreiten und weitere innere Organe befallen. Als bekannteste Mykose gilt die, v.a. durch *Aspergillus fumigatus* ausgelöste, Aspergillose, an der bereits innerhalb der ersten drei Monate 65-70 % der Patienten versterben, nachdem nahezu alle lebenswichtigen Organe befallen werden. Weitere häufig auftretende Mykosen, ausgelöst durch Schimmelpilze, sind die Chromoblastomykose (Bildung warzenartiger, pigmentierter Läsionen der Haut) durch *Phialophora verrucosa*, aber auch *Exophiala* spp. (MATSUMOTO, 2006), die Phaeohyphomykose (geschwürartige, knotige Hautveränderungen mit folgender Infektion verschiedenster Organe und Sepsis) durch *Alternaria* spp., *Curvularia* spp. und *Exophiala* spp. (MATSUMOTO, 2006), die Hyalohyphomykose (Infektion verschiedenster Organe wie Lunge, Haut und Augen) u.a. durch *Fusarium* spp. und *Paecilomyces* spp., sowie Phykomykosen, ausgelöst durch verschiedenste Vertreter der Mucormycotina, die die Nasennebenhöhlen, das Gehirn, den Gastrointestinaltrakt, die Lunge und die Haut besiedeln und zu Embolien und Thrombosen führen können (KÜCK ET AL., 2009). Die häufigsten, durch Hefen ausgelösten, Mykosen sind die Candidose und Kryptokokkose. Bei 80 % der Menschen ist die Spezies *Candida albicans* v.a. im Gastrointestinaltrakt nachweisbar, welche fakultativ zu Mundsoor oder einer Vaginalmykose führen kann. *Cryptococcus neoformans* verursacht eine zunächst unbemerkte Lungeninfektion mit nachfolgender, systemischer Ausbreitung auf Haut, Prostata, Auge und Knochen sowie Entstehung einer Meningoenzephalitis. Die Therapie mykotischer Erkrankungen erfolgt in der Regel durch Gabe von Antimykotika, welche fungizid (abtötend) und/oder fungistatisch (vermehrungshemmend) wirken können und topisch oder systemisch angewandt werden (AKTORIES ET AL., 2004; HAASE, 2009C).

2.1.3.2 Mykotoxikosen

Als Mykotoxikosen werden in der Regel akute oder chronische Schädigungen durch Kontakt mit Mykotoxinen bezeichnet, welche durch den Verzehr von verschimmelten Lebensmitteln und dem damit verbundenen ingerierten, dermalen oder inhalierten Kontakt mit hohen Konzentrationen an Mykotoxinen verursacht werden. Mykotoxine sind Sekundärmetabolite von Pilzen unterschiedlichster, chemischer Stoffgruppen, die ein potentielles Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier darstellen (BENNETT UND KLICH, 2003; JARVIS UND MILLER, 2004; KÜCK ET AL., 2009). Sie können bereits in geringen Konzentrationen toxische Wirkungen entfalten und werden aufgrund ihres geringen Molekulargewichts von unter 1 kDa oft nicht direkt durch das Immunsystem erkannt. Die Wirkungen reichen u.a. von Zytotoxizität, Dermatotoxizität, Hepatotoxizität, Immunotoxizität, Kanzerogenität, Kardiotoxizität, Mutagenität, Nephro- und Neurotoxizität bis hin zur Hämorrhagie (KÜCK ET AL., 2009). Die bedeutendsten Mykotoxine im landwirtschaftlichen Umfeld stellen die Aflatoxine dar, welche durch *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* gebildet werden. Weitere wichtige Mykotoxine sind Ochratoxin A (Vorkommen: viele Kulturpflanzen; Produzenten: verschiedene *Aspergillus* spp. und *Penicillium* spp.), Fumonisine (Vorkommen: Mais, Cornflakes, Produzenten: verschiedene *Fusarium* spp.), Deoxynivalenol (Vorkommen: Gerste, Hafer, Mais, Roggen; Produzenten: verschiedene *Fusarium* spp.) und Zearalenon (Vorkommen: Heu, Gerste, Roggen, Weizen, Hafer, Hirse uvm.; Produzenten: *Fusarium* spp.) (MILLER, 1999; KÜCK ET AL., 2009). Diese Metabolite sind in erster Linie mit der Gefahr hinsichtlich der Entstehung einer Mykotoxikose, nach oraler Aufnahme kontaminierter Lebensmittel, verbunden. Allergische Hypersensitivitätsreaktionen dagegen werden v.a. durch Pilze und deren Sekundärmetabolite/Bestandteile ausgelöst, die entweder in der Außenluft oder im Innenraum zu finden sind (Tabelle 3; JARVIS UND MILLER, 2004).

Tabelle 3: Sekundärmetabolite häufiger Innenraum-assoziiierter Schimmelpilze nach JARVIS UND MILLER (2004)

Pilz	Mykotoxine / Metabolite
<i>Aspergillus sydowii</i>	Aspermutarubrol, Sydowinin, Sydowsäure,
<i>A. unguis</i>	Sterigmatocystin
<i>A. ustus</i>	Austamid, Austdiol, Austin, Austocystin, Kotanin
<i>A. versicolor</i>	Sterigmatocystin, Versicolorin
<i>Eurotium herbarorium</i>	Echinulin, Neoechinulin, Flavoglaucin, Auroglaucin
<i>Talaromyces flavus</i>	Penicilline, Altenusin, Talaroflavone, Funiculolsäure, Mitorubrin, Mitorubrinol, Mitorubrinolacetat, Mitorubrinolsäure, Alternariol, Vermicellin, Purpactin, Vermilutin, Vermiculinsäure
<i>Paecilomyces variotii</i>	Viriditoxin
<i>Penicillium citrinum</i>	Kojisäure, Citrinin, Tanzawa-Säure
<i>P. aurantiogriseum</i>	Auranthine, Penicillinsäure, Verrucosidin, Nephrotoxine
<i>P. brevicompactum</i>	Mycophenolsäure, Brevanamide A und B
<i>P. chrysogenum</i>	Roquefortin, Meleagrin, Chrysogin
<i>P. commune</i>	Roquefortin, Cyclopiazonsäure
<i>P. corylophilum</i>	Citreoisocoumarinol
<i>P. decumbens</i>	Brefeldin A
<i>P. fellutanum</i>	Citrinin, Citreoviridin
<i>P. glabrum</i>	Trypacidin, Citromycetin, Astersäure
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Asperentin, Cladosporinsäure
<i>Chaetomium globosum</i>	Chaetoglobosine, Chaetomin
<i>Memnoniella echinata</i>	Trichodermol, Trichodermin, Dechlorogriseofulvin, Memnobotrin A und B, Memnoconol, Memnoconon
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Makrozyklische Trichothecene, Atranone, Dolabellane, Stachybotrylactone, Laktame
<i>Trichoderma harzianum</i>	Alamethicine, Emodin, Suzukacillin, Trichodermin
<i>Wallemia sebi</i>	Walleminol A und B

2.1.3.3 Mykoallergosen

Bei den Mykoallergosen handelt es sich meist um inflammatorische Hypersensitivitätsreaktionen des respiratorischen Systems durch Inhalation von allergenen Pilzbestandteilen – beta-1,3-Glucan und EPS der Sporen und Myzelien sowie Enzyme wie z.B. Enolasen und Katalasen von *Aspergillus* spp. und mikrobielle, volatile, organische Komponenten (MVOCs) wie Dimethylsulfid, 2-Methyl-1 Butanol, 1-Okten-3-ol und Isobutylether (DAY UND ELLIS, 2001; FISCHER UND DOTT, 2003; KÜCK ET AL., 2009). MVOCs wirken hierbei allerdings weniger als selbständiges Allergen, sondern haben eher eine unterstützende Wirkung bei der Manifestierung des Krankheitsbildes (BURGE, 2004). Der Kontakt mit Pilzsporen spielt v.a. eine Rolle bei Erkrankungen in Abhängigkeit des beruflichen Umfelds wie bei allergischer Alveolitis/hypersensitiver Pneumonie (HODGSON UND FLANNIGAN, 2001), bei der Farmerlunge (REBOUX ET AL., 2001) oder dem Organic Dust Toxic Syndrome (ODTS) (SORENSEN ET AL., 2001). Außerdem zeigte sich eine Assoziation bezüglich der Manifestation von Rhinitis (LI UND HSU, 1997). Innenraum-assoziiertes Pilzwachstum, vor allem in Verbindung mit Feuchtigkeit, wurde hauptsächlich mit der Entstehung von allergischem Asthma in Verbindung gebracht (FISCHER UND DOTT, 2003; JARVIS UND MILLER, 2004; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2004; HEALTH CANADA, 2004; MENDELL ET AL., 2011). Schimmelpilze besiedeln u.a. Wände, Tapeten, Textilien, Holz und Leder und geben eine hohe Anzahl an Sporen mit einer immensen Anzahl an Antigenen – Glyko- und Lipoproteine der Pilzsporen sowie verschiedenste Enzyme (SIMON-NOBBE ET AL., 2007) – und Metabolite (Tabelle 3; JARVIS UND MILLER, 2004) in die Innenraumluft ab. Hauptvertreter sind hierbei *Aspergillus* und *Penicillium* (Primärbesiedler; $a_w < 0,8$), *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* und *Mucor* (Sekundärbesiedler; a_w 0,8-0,9) sowie *Chaetomium*, *Rhizopus* und *Stachybotrys* (Tertiärbesiedler; $a_w > 0,9$) (FLANNIGAN UND MILLER, 2001; KÜCK ET AL., 2009).

Der Begriff Asthma wurde bereits im Altertum durch Hippokrates, Aretaeus und Galen geprägt. Er wurde jedoch damals noch mit allen Formen der Atemnot in Verbindung gebracht (SAKULA, 1984). Erst im Laufe des späten 17. und frühen 18. Jahrhunderts gelang dem britischen Arzt Sir John Floyer, selbst Asthmatiker, in seinen Abhandlungen über Asthma („A Treatise of the Asthma“, 1. Ausgabe 1698) erstmals eine Abgrenzung gegenüber anderen pulmonären Erkrankungen. Dabei beobachtete er u.a. asthmatische Reaktionen eines Patienten nach Besuch eines Weinkellers aufgrund von Feuchtigkeit und Pilzexposition (SAKULA, 1984; DAY UND ELLIS, 2001).

Mittlerweile nimmt man an, dass die Exposition mit Feuchtigkeit und Schimmelpilzen das Risiko einer Lungenerkrankung um 30-50 % erhöht (FISK ET AL., 2007). Über 100 Arten sind als Allergie-auslösend beschrieben (HORNER ET AL., 1995; KÜCK ET AL., 2009). V.a. die Gattungen *Alternaria* und *Cladosporium* sowie *Aspergillus* und *Penicillium* sind hierbei zu nennen (MORROW UND LOWE, 1943; HORNER ET AL., 1995; SENKPIEL ET AL., 1996; BUSH UND PORTNEY, 2001; DOWNS ET AL., 2001; JACOB ET AL., 2002; HARRIES ET AL., 2004; SIMON-NOBBE ET AL., 2008). Allgemein äußert sich eine Schimmelpilzallergie mit ähnlichen Symptomen wie eine Pollen- oder Hausstauballergie mit Schleimhautentzündungen, Rhinitis, allergischem Asthma oder Alveolitis, kann jedoch auch über die Mundschleimhaut im Gastrointestinaltrakt zu Sodbrennen, Brechreiz oder Darmfunktionsstörungen führen (KÜCK ET AL., 2009). 6-24 % der Bevölkerung und 44 % der Atopiker zeigen eine Sensibilisierung gegenüber Schimmelpilzen sowie 80 % der Asthmatiker eine dadurch verursachte allergische Reaktion (SIMON-NOBBE ET AL., 2008). Innerhalb der Asthmatiker variiert der Anteil sensibilisierter Patienten von 45 % bei asthmatischen Kindern und 70 % bei Erwachsenen (HSIEH UND SHEN, 1988). Zudem zeigen diese häufig auch eine spezifische IgE-Reaktivität gegenüber einer ganzen Reihe von Schimmelpilzen sowie gegenüber Pollen und Lebensmittelallergenen (BURGE, 1985; HORST ET AL., 1990). Die zugrundeliegenden Hypersensitivitätsreaktionen lassen sich in vier Gruppen einteilen: (a) IgE-induziert („klassische Allergie“), (b) zytotoxisch, IgG-/IgM-vermittelt, (c) Immunkomplex-induziert (Antigen-Antikörper-Komplex) und (d) Zell-mediiert über T-Lymphozyten (GELL UND COOMBS, 1963). Allergisches Asthma und Heuschnupfen (allergische Rhinitis) zählen zu den Allergien des Typ I. Hypersensitive Pneumonie/allergische Alveolitis und allergische Sinusitis sind Mischvarianten von Typ III und IV bzw. von Typ I, III und IV (SIMON-NOBBE ET AL., 2008).

Als Asthma wird generell eine reversible Obstruktion der Atemwege bezeichnet; charakterisiert durch eine chronische Entzündung der bronchialen Mukosa und Empfindlichkeit der bronchialen Muskulatur sowie durch merkliche Änderungen der Ausatemleistung. Asthmatische Reaktionen können unmittelbar über eine Typ I-Hypersensitivitätsreaktion (IgE), später über eine IgG-vermittelte Reaktion oder dual, d.h. beide Typen in Kombination, auftreten. Diese verursachen in der Regel Atemnot, einhergehend mit beträchtlichem Keuchen und Husten (DAY UND ELLIS, 2001; MASOLI ET AL., 2004). Neben dem oben genannten allergischen (extrinsischen) Asthma gibt es auch nicht-allergisches (intrinsisches) Asthma, bedingt durch virale Infektionen,

Medikamentenunverträglichkeiten und Reinigungsmittel. Beide Formen weisen pathogenetische Übereinstimmungen auf (ROMANET-MANENT ET AL., 2002; ZOCK ET AL., 2007). Allergische Reaktionen treten normalerweise in Verbindung mit einem Kontakt mit Allergenen auf. Kleinere Sporen mit $< 10 \mu\text{m}$ (z.B. *Alternaria*, *Aureobasidium* und *Cladosporium*) oder sogar $< 5 \mu\text{m}$ (z.B. *Aspergillus*, *Penicillium* und *Verticillium*) können tief in die Lunge vordringen und dort allergische Reaktionen, die sich in Asthma manifestieren können, auslösen (PEPYS, 1965; DANKAART ET AL., 1991; ABDEL HAMEED ET AL., 2004). Partikel mit einer Größe von über $10 \mu\text{m}$ wie Pollen und größere Sporen (z.B. bei *Epicoccum nigrum*; $17,2 \mu\text{m}$; ABDEL HAMEED ET AL., 2004) können zwar nur in den oberen Bereich des respiratorischen Systems wie den Nasopharynx vordringen; können aber neben der Entstehung von nasalen oder okularen Symptomen, wie bei Heuschnupfen (LUO, 1991), auch zu Asthmaanfällen und chronischem Asthma führen (SUPHIOGLU ET AL., 1992).

Das Krankheitsbild Asthma ist global verbreitet; Schätzungen zufolge sind ca. 300 Millionen Menschen weltweit und etwa 30 Millionen allein in Europa davon betroffen. Die Anzahl an Erkrankten soll zudem bis 2025 um weitere 100 Millionen ansteigen (ERS UND ELF, 2003; MASOLI ET AL., 2004). Jährlich sterben etwa 180.000 Patienten an den Folgen von Asthma (WHO, 2004), wobei hauptsächlich Personen in einem Alter von über 45 Jahren betroffen sind (BURR ET AL., 1999). Europaweit gesehen, weisen Griechenland die geringsten und Irland, Luxemburg, Westdeutschland, Belgien, Frankreich sowie England und Wales die höchsten Mortalitätsraten auf (EUROPEAN LUNG WHITE BOOK, 2003). MASOLI ET AL. (2004) berichteten von einer allgemeinen Asthmaprävalenz von 10 % in den entwickelten Ländern, mit den höchsten Werten im Vereinigten Königreich (15-18 %), Neuseeland (15,1 %), Australien (14,7 %), Irland (14,6 %), Kanada (14,1 %), USA (10,9 %), Deutschland und Frankreich (7,0 %). Aktuelle Studien im Rahmen der Weltgesundheitsüberprüfung (World Health Survey, WHS) zeigten eine allgemeine weltweite klinische Asthmaprävalenz von 4,5 %, mit den höchsten Werten in Australien (21,5 %), Schweden (20,2 %), im Vereinigten Königreich (18,2 %), in den Niederlanden (15,3 %) und in Brasilien (13,0 %; TO ET AL., 2012). In Deutschland und Frankreich wurden Prävalenzen von 7,5 % bzw. 10,6 % ermittelt. Die stärksten Unterschiede zwischen ländlichen (3,7 %) und städtischen (5,1 %) Regionen wurden bei der amerikanischen Population festgestellt (TO ET AL., 2012). In englischsprachigen Gebieten erreicht das Asthmarisiko speziell bei Kindern teilweise Werte $> 30 \%$ und tritt häufiger bei Jungen als bei Mäd-

chen auf (KAY, 2001; MOSALI ET AL., 2004). Während die Erkrankung bei den meisten Kindern mild verläuft und bei 30-50 % bis zum Eintritt in das Erwachsenenalter wieder verschwindet, treten die Symptome bei manchen jedoch später wieder auf. 5-10 % der Kinder bleiben ihr Leben lang schwere Asthmatiker (MARTIN ET AL., 1982; GERRITSEN ET AL., 1989; PATON, 2007). Die Behandlungskosten erreichen in den westlichen Ländern 1-2 % des gesamten Budgets des Gesundheitswesens und übersteigen diejenigen für Tuberkulose und HIV in Kombination (MASOLI ET AL., 2004; WHO, 2004). Im Schnitt werden 300 bis 1.300 Dollar pro Patient und Jahr und insgesamt etwa 17 Milliarden Dollar in den USA sowie 21,9 Milliarden Dollar (ca. 17,7 Milliarden Euro) in Europa ausgegeben (SULLIVAN ET AL., 1996; ERS UND ELF, 2003; MUDARRI UND FISK, 2007). Etwa 50 % hiervon entstehen durch sogenannte indirekte, therapieunabhängige Kosten aufgrund von Arbeitskraftverlust, bedingt durch Krankheitstage des Patienten direkt oder von dessen Angehörigen sowie durch Frühpensionierungen oder frühzeitigem Ableben (BARNES ET AL., 1995; EFAADPA, 2005). 10-20 % der Patienten verursachen 50 % der Kosten; hierbei stehen die schwer an Asthma Erkrankten im Vordergrund (SERRA-BATLLES ET AL., 1998; BEASLEY, 2002; GODARD ET AL., 2002; ANTONICELLI ET AL., 2004). Asthma wird zu 60 % vererbt (DUFFY ET AL., 1990); mehrere genetische Faktoren sind mittlerweile identifiziert (MOFFATT ET AL., 2010). Der Anstieg der weltweiten Asthmaprävalenz liegt aber auch an sich verändernden Umwelteinflüssen in der industrialisierten Welt, wie Kontakt zu Mikroorganismen, Luftverschmutzung, Allergenexposition innen und außen und Ernährungsverhalten (BRAMAM, 2006). MUDARRI UND FISK (2007) schätzten, dass etwa 21 % der mit Asthma verbundenen Kosten mit Feuchtigkeit und Schimmelbefall im Haus assoziiert sind. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sich die Asthmaprävalenzen in den ostdeutschen Regionen nach dem Mauerfall im Zuge steigender Industrialisierung erhöhten, während sie im westdeutschen Raum auf dem Niveau vor der Wende blieben (HEINRICH ET AL., 1998). Dieser Effekt scheint jedoch Kohorten-spezifisch in Abhängigkeit der Lebensbedingungen in der Kindheit zu sein und damit nicht generell zu gelten (WICHMANN, 1995).

2.1.4 Zusammenhänge zwischen Pilzexposition und Asthmaprävalenz

Die umweltbedingte Exposition mit Mikroorganismen ist einerseits positiv assoziiert mit respiratorischen Erkrankungen wie allergischem Asthma, Rhinitis oder COPD (s. Punkt 2.1.3.2.2; LINNACKER UND SMEDLEY, 2002; RADON ET AL., 2004; SINGH UND

SCHWARTZ, 2004; RADON ET AL., 2006). Auf der anderen Seite beschreiben zahlreiche Studien einen möglicherweise protektiven Effekt gegenüber der Manifestierung von Lungenerkrankungen, v.a. von Asthma, in Bezug auf den intensiven Kontakt mit Mikroorganismen im Kindesalter (RIEDLER ET AL., 2001; VON MUTIUS ET AL., 2001; BRAUN-FAHRLÄNDER ET AL., 2002; LAUENER ET AL., 2002; BRAUN-FAHRLÄNDER UND LAUENER, 2003; VAN STRIEN ET AL., 2004; KABESCH UND LAUENER, 2004; EGE ET AL., 2006; PERKIN UND STRACHAN, 2006; EGE ET AL., 2007; DEBARRY ET AL., 2007; EGE ET AL., 2011; EGE ET AL., 2012). Der Effekt einer niedrigeren Asthmaprävalenz bei Schulkindern tritt signifikant stärker in ländlichen als in städtischen Gebieten auf (VON EHRENSTEIN ET AL., 2000; VON MUTIUS UND RADON, 2008) und intensiviert sich, je höher die mikrobielle Exposition ist (VARTIAINEN ET AL., 2002). EGE ET AL. (2011) konnten zeigen, dass Aufwachsen auf einem Bauernhof mit einer höheren Diversität mikrobieller Exposition assoziiert war und gleichzeitig die Diversität der mikrobiellen Exposition mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eines Erkrankens an Asthma verbunden war. Zudem ist dies auch im Vergleich von Bauernkindern und Kindern aus demselben Wohnort, jedoch ohne Bauernhofkontakt, zu beobachten. Diesem sogenannten „Bauernhofeffekt“ (VON MUTIUS UND VERCELLI, 2010) liegt die „Hygienehypothese“ zugrunde, die vor allem auf Beobachtungen von STRACHAN (1989) beruht. Heute versteht man unter der Hygienehypothese, dass seltenere Infektionen im Kindesalter, v.a. in Industrienationen, bedingt durch eine bessere Hygiene, einen besseren Impfstatus und den Einsatz von Antibiotika, zu einer Veränderung des Immunsystems und einer damit verbundenen Reaktion auf bisher unschädliche Substanzen führen. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei das normalerweise vorherrschende Gleichgewicht zwischen der Typ 1 (T_H1 ; zellulär; bei bakterieller oder viraler Infektion und Autoimmunerkrankungen) und Typ 2 (T_H2 ; humoral; bei allergischen Reaktionen und parasitären Infektionen) Immunantwort. Geringer Kontakt mit mikrobiellen oder viralen Pathogenen im Kindesalter, v.a. während der Entwicklung des Immunsystems (BRAUN-FAHRLÄNDER ET AL., 2002), scheint daher bei einem späteren Kontakt zu einer ungenügenden Induktion der T_H1 -Antwort zu führen, die daraufhin eine überschießende T_H2 -Antwort nicht mehr ausgleichen kann und dies in einer Prädisposition für Allergien resultiert (VON MUTIUS UND VERCELLI, 2010). Je früher und intensiver ein Kind mit Mikroorganismen auf dem Bauernhof (im Stall oder durch den Konsum von frischer Kuhmilch) in Kontakt kommt, desto besser ist der „Schutz“ vor allergischem Asthma gewährleistet (RIEDLER ET AL., 2001; VON BERG ET AL., 2003; WASER ET AL.,

2006), sodass dieser auch bis ins Erwachsenenalter anhalten kann (LEYNAERT ET AL., 2006; RADON ET AL., 2006). Zudem konnten EGE ET AL. (2006) bzw. DOUWES ET AL. (2008) zeigen, dass sogar eine pränatale Exposition durch die Arbeit der Mutter im Stall mit einer niedrigeren Prävalenz gegenüber atopischer Sensibilisierung bzw. Asthmaprävalenz beim Kind verbunden ist. Die zugrundeliegenden Daten basieren hauptsächlich auf epidemiologischen Studien zur Messung von Pilzkomponenten wie beta-1,3-Glucan und EPS (SCHRAM-BIJKERK ET AL., 2005; EGE ET AL., 2007; GEHRING ET AL., 2007), die in allen Fällen eine inverse Assoziation von Aufwachsen auf einem Bauernhof mit Asthma zeigten, jedoch keine Aussage bezüglich spezifischer Pilzgattungen zuließen. EGE ET AL. (2011) konnten zwar im Zuge der GABRIEL-Studie (Multidisziplinäre Studie zur Identifikation der genetischen und umweltbeeinflussten Ursachen für Asthma in der Europäischen Gemeinschaft; GENUNEIT ET AL., 2011) bei den Bauernhofkindern eine signifikant höhere Exposition durch *Penicillium* spp., *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *Eurotium amstelodami* sowie *Eurotium* spp., *Wallemia sebi* und weißen Hefen nachweisen. Bei den signifikant mit Asthma invers assoziierten Kandidaten *Penicillium* und *Eurotium* war jedoch nur eine Genus-spezifische Aussage möglich. Diese beiden Genera wurden zwar auch mit der Induktion von Asthma in Verbindung gebracht (SAHAKIAN ET AL., 2008), jedoch waren generische Marker der beiden Genera in einer vorherigen Studie als signifikant invers assoziiert gefunden worden (EGE ET AL., 2007).

2.2 Qualitativer und quantitativer Nachweis von Pilzen

2.2.1 Direktmikroskopie

Als Schnellmethode zur Identifizierung von vorhandenen Pilzen im Probenmaterial dient die direkte mikroskopische Beurteilung. Hierbei werden Tesafilmabklatsche von organischen beziehungsweise Abstriche, Punktate oder Biopate von humanen/tierischen Materialien genommen. Diese werden mit Methylenblau oder Lactophenolblau auf dem Objektträger eines Mikroskops eingefärbt, um die Sichtbarkeit von Sporen und Hyphen zu erhöhen (BAUER UND SCHWAIGER, 2011). Für die mikroskopische Bestimmung von Pilzspezies ist allerdings ein hohes Maß an Erfahrung notwendig (UIJTHOF, 1996; YAMAMOTO ET AL., 2011).

2.2.2 Kulturelle Nachweisverfahren

Der Nachweis und die Bestimmung klinisch relevanter Hefen und Schimmelpilze werden häufig kulturell, d.h. über Aufbringung der Proben auf geeignete Nährmedien und nachfolgender, mehrtägiger Inkubation bei Raumtemperatur, durchgeführt. Als universelle Nährmedien werden z.B. Sabouraud-Agar (SABOURAUD, 1892; ODDS, 1991) und DG18-Agar (HOCKING UND PITT, 1980) eingesetzt. Die Menge an Pilzen in einer Probe wird in „Kolonie-bildenden Einheiten (KbE)“ (= Colony-forming Units, CFU) quantifiziert und in Relation der Menge an Probenmaterial, z.B. CFU/g Staub, gesetzt (BREED UND DOTTERER, 1916). Die kulturelle Bestimmung von Pilzspezies ist jedoch nicht nur zeitaufwendig, sondern bedarf einer großen Erfahrung und Expertise (UIJTHOF, 1996; YAMAMOTO ET AL., 2011). Limitierende Faktoren sind zudem die Auswahl des Kulturmediums (TAKAHASHI, 1997), die Nicht- oder nur Schwer-Kultivierbarkeit vieler, v.a. filamentöser, Schimmelpilze, aber auch Hefen wie *Exophiala* spp., und die Begrenzung auf lebensfähige Sporen und Hyphen (AMANN ET AL., 1995; THORN, 1997; DOUWES ET AL., 1999; VAN ELSAS ET AL., 2000; MEKLIN ET AL., 2004; LIGNELL ET AL., 2008; VICENTE ET AL., 2008). Zusätzlich werden bei der Kultivierung Pilze mit hohen Wachstumsraten und vielen Sporen in der Probe bevorzugt, was eine quantitative Aussage erschwert (DIX UND WEBSTER, 1995; MACNEIL ET AL., 1995; HUGENHOLTZ UND PACE, 1996). Bei *Alternaria* spp. und *Fusarium* spp. überwiegt der Hyphen-, bei *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. und *Rhizopus* spp. der Sporenanteil (SCHNÜRER, 1993; KARAKOUSIS ET AL., 2006). Die Bestimmung der Pilzquantität erfolgt in der Regel über die Sporenkonzentration. Sporen machen jedoch nur ca. 3-5 % der gesamten Pilzbiomasse aus, sodass die Quantifizierung in CFU/g keine verlässliche Aussage über die tatsächliche Biomasse zulässt (SCHNÜRER, 1993). Schätzungen zufolge können an sich nur < 1 bis 79 % der mikrobiellen Biomasse mit kulturellen Methoden nachgewiesen werden (TOIVOLA ET AL., 2004; NIEMEIER ET AL., 2006).

2.2.3 Kulturunabhängige Nachweisverfahren

Aufgrund der vielen limitierenden Faktoren der kulturellen Bestimmung der Pilzdiversität und -quantität in komplexen Matrices wie Staub (s. Punkt 2.2.1) wurde vermehrt dazu übergegangen, kulturunabhängige Verfahren anzuwenden, um die traditionelle Identifikation und die Detektion von bisher nicht oder nur schwer kultivierbaren Pilzen zu erweitern (KIRK ET AL., 2004; YAMAMOTO ET AL., 2011; SHENDELL ET AL., 2012). Zahlreiche, bereits bekannte, molekularbiologische Techniken wurden für die Unter-

suchung von mikrobiellen Gemeinschaften in den letzten Jahrzehnten optimiert. Jedes dieser Verfahren weist aber wiederum für sich spezielle Vor- und Nachteile auf (PRICE, 1972; REED ET AL., 2003; KIRK ET AL., 2004).

2.2.3.1 Serologie

Der serologische bzw. immunomykologische Nachweis von Pilzen erfolgt über die Detektion spezifischer, Pathogen-assoziiertes Antikörper oder Antigene im Serum von Patienten. Mögliche Varianten sind einerseits die Anwendung des Immundiffusionstests (COLEMAN UND KAUFMAN, 1972; MERZ ET AL., 1977) und der Serumkomplement-Fixierung (BAUMAN UND SMITH, 1975; KAUFMAN UND CLARK, 1974) zur Detektion der Immunantwort gegenüber Pilzantigenen. Diese sind jedoch auf einen immunokompetenten Patienten, der eine Antikörperbildung zeigt, angewiesen und lassen keine morphologische Identifikation von Pilzen in infiziertem Gewebe zu (REED ET AL., 1993). Des Weiteren können sie zu falsch-positiven Ergebnissen (HOLDER ET AL., 1977) und zu Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen Pilzen führen (CAMPBELL UND BINKLEY, 1953). Auf der anderen Seite gibt es zytochemische Testverfahren unter Einsatz von Antiseren (REED ET AL., 1993). Hierbei werden Antikörper zum Nachweis speziesspezifischer Antigene in der Blutprobe eingesetzt. Vorteil hierbei ist, dass keine vorgeschaltete Immunreaktion durch den Patienten vorgelegen haben muss, da die spezifischen Antikörper von außen zugegeben werden. Die getesteten Antiseren zeigen starke Reaktivitäten gegenüber ihren „Zielpilzen“, jedoch ebenfalls zum Teil deutliche Kreuzreaktivitäten zwischen verschiedenen Pilzen. Dies verhindert eine spezifische Detektion (REED ET AL., 1993). Außerdem sind Genus- oder Spezies-spezifische Antikörper oder Antigene nicht für den Einsatz in Gemeinschaftsanalysen geeignet.

2.2.3.2 DNA-basierte Verfahren

Methoden zum Nachweis Pilz-spezifischer DNA basieren auf dem Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), sodass auch geringste DNA-Mengen durch deren Vervielfältigung detektiert werden können. Während ein Erregernachweis durch Verwendung Spezies-spezifischer Primer direkt über die PCR im Einzel- oder Multiplexansatz erfolgen kann, sind für Gemeinschaftsanalysen weitere Verfahren zur Bestimmung der Diversität notwendig. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

2.2.3.2.1 Extraktion von Pilz-DNA

Pilze besitzen eine hochkomplexe, mechanisch stabile Zellwand, deren Aufbau einfacher als bei Pflanzen, jedoch komplexer als bei Bakterien ist (SORENSEN, 2001; HAASE, 2009B). Sie besteht hauptsächlich aus Polysacchariden (ca. 80 % der Trockenmasse) und Proteinen (3-20 %; Abbildung 1). Zwei funktionelle Gruppen lassen sich hierbei unterscheiden: (a) strukturelle Komponenten wie Chitin (0,6-9 %), beta-1,3- und beta-1,6-Glukane (40-60 %) und Mannoproteine; (b) stabilisierende Komponenten wie alpha-Glukane, beta-Glukane, Chitosane, Polyuronide, Lipide, anorganische Salze und Pigmente. Der häufigste Zucker ist Glucose (RUIZ-HERRERA, 1992). Die Zellmembran besteht vorwiegend aus Ergosterol (HAASE, 2009B).

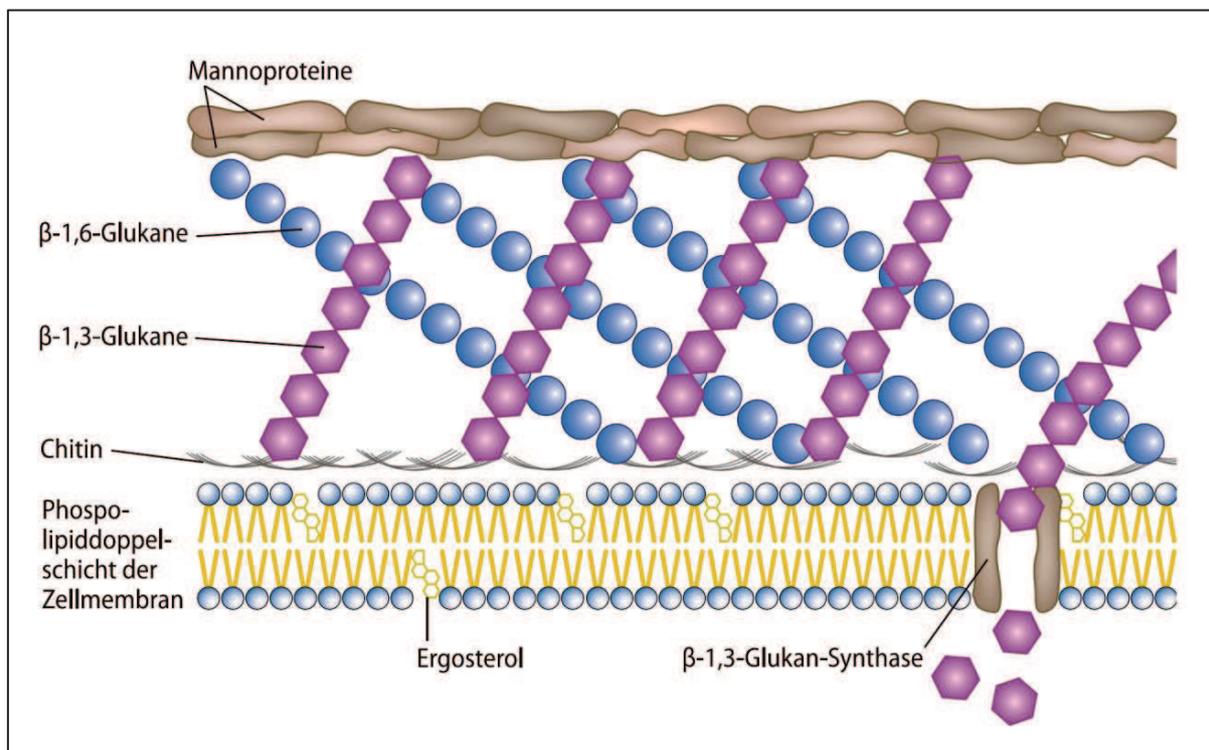


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Pilzellwand (HAASE, 2009B)

Aufgrund dieser Komplexität und Robustheit ist die Zellwand häufig resistent gegenüber vielen DNA-Extraktionsansätzen (VAN BURIK ET AL., 1997), sodass bisher auch keine universelle, für alle Pilzarten geeignete Variante gefunden werden konnte (KARAKOUSIS, 2006). Damit ist jedes Mal die Evaluierung und Validierung einer Extraktionsmethode in Abhängigkeit von Probenmatrix und Pilzen notwendig. Die Effizienz der Zellyse kann zwischen verschiedenen Pilzelltypen variieren. Sporen las-

sen sich dabei anders lysieren als Myzelien, und auch Myzelien verschiedenen Alters können unterschiedliche Lysiseigenschaften besitzen (PROSSER, 2002). Aus diesem Grund wird mittlerweile meist eine mechanische Destabilisierung mit Glass Beads vorangestellt. Dieser Zusatzschritt erwies sich bereits als zielführend (MÜLLER ET AL., 1998) und resultierte in höheren DNA-Ausbeuten sowie geringeren Inhibitor-konzentrationen (ROOSE-AMSALEG ET AL., 2001; LAKAY ET AL., 2007). Weitere Ansätze verwenden Mörserzerkleinerung (KARAKOUSIS, 2006), tiefes Einfrieren mit sofortigem Auftauen (HAUGLAND ET AL., 1999; LEINBERGER ET AL., 2005), Hitze- und alkalische Behandlung (LÖFFLER ET AL., 1997), Säurebehandlung (KARAKOUSIS, 2006), Ultraschallbehandlung (HAUGLAND ET AL., 1999; KARAKOUSIS, 2006) oder die enzymatische Behandlung mit dem Enzym Lyticase (LEINBERGER ET AL., 2005; KARAKOUSIS, 2006; FREDLUND ET AL., 2008; DORN-IN, 2012). Dennoch kann die DNA-Isolierung oder die Befreiung der Proben von Inhibitoren wie Nukleasen, Polysacchariden und Pigmenten fehlschlagen und damit einen Nachweis über PCR-Amplifikation im Folgenden verhindern (MÜLLER ET AL., 1998; SMIT ET AL., 1999). Zudem zeigte sich, dass die DNA-Extraktion umso schwieriger ist, je geringer die Pilzmenge in der jeweiligen Probe ist (KARAKOUSIS, 2006).

2.2.3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Primerwahl

Mittlerweile sind PCR-basierte Verfahren bei taxonomischen Untersuchungen und Diversitätsanalysen am verbreitetsten (KIRK ET AL., 2004). Die PCR-Methode wurde 1983 von dem amerikanischen Biochemiker Kary Mullis entwickelt und 1985 erstmals veröffentlicht (SAIKI ET AL., 1985). Die PCR ist ein zyklisches Verfahren aus Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung (Annealing) von sequenzspezifischen Oligonukleotiden an die DNA-Einzelstränge und nachfolgender, enzymatischer Verlängerung dieser sogenannten Primersequenzen zum Komplementärstrang der Ausgangsmatrize. Damit können in kürzester Zeit geringste DNA-Mengen in einer Probe so stark vermehrt werden, dass ein visueller Nachweis im Agarosegel möglich wird. Neben dieser „klassischen“, qualitativen PCR wurde zudem die sogenannte quantitative PCR (qPCR) entwickelt, die, unter Verwendung von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. SYBR-Green) oder sequenzspezifischen Hybridisierungssonden, in Echtzeit („real-time“) eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge zulässt (ABBOTT ET AL., 1988; HEID ET AL., 1996). Obwohl zunächst auch als Endpunkt-Analysemethode konzipiert und für eine Aussage hinsichtlich absoluter Quan-

tität eingesetzt, wird diese mittlerweile häufig für Genexpressionsanalysen (relative Quantifizierung) angewendet (VAN GUILDER ET AL., 2008). Sie zeigt hierbei zudem eine deutlich höhere Sensitivität als die qualitative PCR (BLACK, 2009). Zur Bestimmung der Schimmelpilzexposition entwickelte HAUGLAND UND VESPER (2002) Spezies-spezifische Primerpaare und Hybridisierungs sonden für die qualitative und quantitative PCR (Mold-specific qPCR; MSQPCR), welche inzwischen in vielen Studien Anwendung finden (MEKLIN ET AL., 2004; KESWANI ET AL., 2005; PIETARINEN ET AL., 2008; YAMAMOTO ET AL., 2011). Zudem etablierte VESPER ET AL. (2007B) einen darauf basierenden nationalen Index zur Beurteilung des Schimmelbefalls in amerikanischen Wohnhäusern (Environmental Relative Moldiness Index; ERMI).

Für die Untersuchung von Pilzgemeinschaften sind universelle Primerpaare, die möglichst alle, jedoch zumindest die meisten Genera und Spezies amplifizieren können, notwendig. Analog zur 16S rDNA der Bakterien werden auch bei den Pilzen die Abschnitte der ribosomalen DNA (rDNA) als phylogenetische Marker angewendet (WOESE ET AL., 1990; STACKEBRANDT UND GOEBEL, 1994; HUGENHOLTZ UND PACE, 1996; BEGEROW ET AL., 2010; SCHOCH ET AL., 2012). Ein Grund für die präferierte Verwendung der Teilabschnitte der rDNA-Region für Diversitätsanalysen ist die hohe Anzahl an Kopien pro haploidem Genom. Diese variiert von 60-90 bei *Coprinus cinereus* („Struppiger Tintling“; CASSIDY ET AL., 1984) von bis zu 251 bei *Thanatephorus praticola*, anamorph *Rhizoctonia solani*, ein Pflanzenpathogen bei Zuckerrüben und Kartoffeln (VILGALYS UND GONZALEZ, 1990). Dies ist v.a. bei Proben mit geringer DNA-Konzentration von Vorteil und wird damit der Vision einer DNA-Barcode-Region gerecht (O'BRIEN ET AL., 2005). Die rDNA-Region der Pilze umfasst die Internal Transcribed Spacer (ITS)-Region, bestehend aus den Teilregionen ITS1 und ITS2, welche durch das 5,8S rRNA Gen voneinander getrennt und von der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU) der 18S rDNA und von der großen ribosomalen Untereinheit (LSU) der 28S rDNA flankiert werden. Die ITS-Region ist hierbei zur Zeit diejenige DNA-Sequenz mit der höchsten Präferenz für die Anwendung zur Identifikation sowohl von einzelnen Taxa als auch von Pilzgemeinschaften (HORTON UND BRUNS, 2001; BRUNS UND SHEFFERSON, 2004; BELLEMAIN ET AL., 2010) und wird mittlerweile, analog zu 16S rDNA der Bakterien (STACKEBRANDT UND GOEBEL, 1994), als universeller DNA-Barcode für Pilze postuliert (SCHOCH ET AL., 2012). Ein Grund hierfür ist v.a. die hohe Variabilität der ITS1-Region sowie die Variabilität bis Semi-Konserviertheit der ITS2-Region (HILLIS UND DIXON, 1991; HERSHKOVITZ UND LEWIS, 1996) gegen-

über den vergleichsweise konservierten Regionen der 18S und 28S rDNA und der stark konservierten 5,8S rDNA. Für phylogenetische Studien wird zwar auch die 18S rDNA häufig untersucht, sie weist aber weniger hypervariable Regionen als ihr Homolog 16S rDNA sowie die ITS-Region auf. Die Konserviertheit der Strukturen erleichtert allerdings wiederum das Primerdesign für die Amplifikation der ITS-Region. Abbildung 2 zeigt die Lage der Zielregion der in dieser Studie eingesetzten Primer. Neben den genannten Strukturen gibt es im Bereich der rDNA-Region der Pilze auch noch den sogenannten „Intergenic Spacer“ (IGS), der häufig für tRNAs codiert (FISHER UND TRIPLETT, 1999), eine hohe innerartliche Sequenzvariabilität aufweist und damit vorzugsweise für die Spezies-spezifische Unterscheidung innerhalb eines Genus Anwendung findet (GUIDOT ET AL., 1999; MARTIN ET AL., 1999).

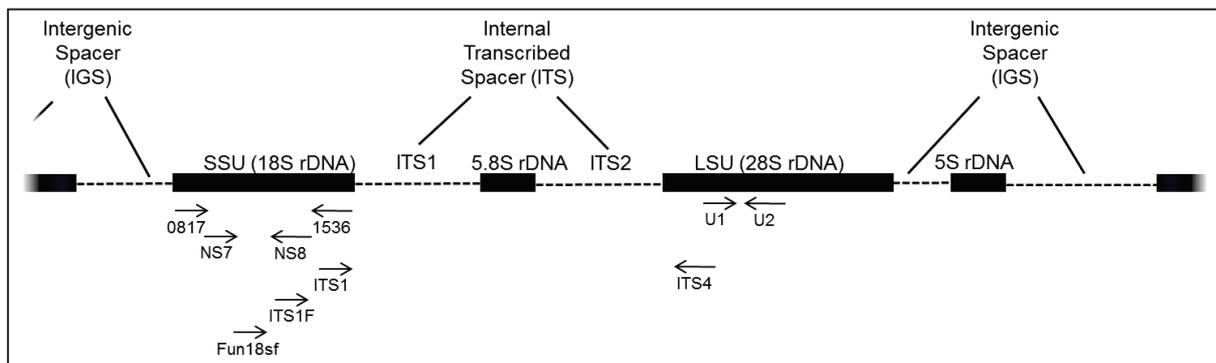


Abbildung 2: Darstellung der ribosomalen DNA der Pilze mit den Zielregionen der eingesetzten Primer

Ein nicht zu vernachlässigender Nachteil PCR-basierter Anwendung in der Gemeinschaftsanalyse ist jedoch die Bevorzugung dominanter Spezies in der Probe (MACNAUGHTON ET AL., 1999; KIRK ET AL., 2004).

2.2.3.2.3 Gelbasierte Nachweisverfahren

Gelbasierte Nachweisverfahren zur Bestimmung der Pilzdiversität stellen eine Sequenz-spezifische, elektrophoretische Auftrennung der negativ-geladenen DNA im elektrischen Feld nach vorheriger PCR-Amplifikation dar. Zu den üblicherweise eingesetzten Methoden gehören DGGE/TGGE (MUYZER ET AL., 1993), (T-) RFLP (LIU ET AL., 1997; TIEDJE ET AL., 1999) (A)RISA (FISHER UND TRIPLETT, 1999) und PCR-SSCP (ORITA ET AL., 1989; SCHWIEGER UND TEBBE, 1998). Gemein haben sie, dass hierbei mit universellen Barcode-Primern gearbeitet wird, allerdings eine direkte Zuordnung

Gelbände/Pilzspezies nicht möglich und damit eine nachfolgende Sequenzierung der Gelbände unabdingbar ist. Dies liegt hauptsächlich daran, dass teilweise eine Bande mehrere, unterschiedliche Sequenzen beinhalten, aber auch eine Spezies in mehreren Bänden repräsentiert sein kann (ORTÍ ET AL., 1997; GELSOMINO ET AL., 1999; SUNNUCKS ET AL., 2000; KORTHALS ET AL., 2008A; KORTHALS, 2009).

DGGE/TGGE

Die Denaturierende bzw. Temperatur-Gradienten Gelelektrophorese wurde ursprünglich für die Detektion von Punktmutationen entwickelt (MUYZER ET AL., 1993). Hierbei können theoretisch DNA-Sequenzen mit einem Unterschied von nur einer Base voneinander getrennt werden (MILLER ET AL., 1999), was jedoch in der Praxis, v.a. bei hochdiversen Proben, nicht immer gelingt (GELSOMINO ET AL., 1999). Charakteristisch für die DGGE-Analyse ist eine GC-Klammer am 5'-Ende der DNA-Sequenz, die eine Separation der DNA-Sequenz in ihre Einzelstränge bei steigender Konzentration der denaturierend wirkenden Chemikalien verhindert (MUYZER ET AL., 1993). Kritisch zu betrachten ist hier die reproduzierbare Einstellung des chemischen bzw. Temperatur-Gradienten im Polyacrylamidgel (LYAUTEY ET AL., 2003; POWELL ET AL., 2003; NUNAN ET AL., 2005; HONG ET AL., 2007; SMALLA ET AL., 2007). Zudem tendieren die Bände teilweise zur Unschärfe (HORI ET AL., 2006; KORTHALS, 2009).

(T-) RFLP

Die Methode der Analyse des (Terminalen) Restriktionsfragment-Längenpoly-morphismus verwendet Restriktionsenzyme, welche die DNA-Sequenz in kurze Fragmente schneiden. Die daraus resultierenden, unterschiedlichen Fragmentgrößen werden im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel separiert (LIU ET AL., 1997). Während die RFLP-Analyse jedoch nur eine Aussage über strukturelle Veränderungen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft zulässt, ermöglicht die T-RFLP-Analyse zusätzlich eine Bestimmung der Diversität (TIEDJE ET AL., 1999). Dabei wird der reverse Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und nur das terminale Restriktionsfragment weiter analysiert. (LIU ET AL., 1997). Aufgrund der Automatisierbarkeit zeigt diese Methode eine hohe Durchsatzrate sowie eine hohe Reproduzierbarkeit (OSBORN ET AL., 2000). Nachteilig sind die generellen Fehlerquellen DNA-basierter Verfahren wie DNA-Extraktion, PCR-Amplifikation und Primerauswahl, jedoch auch die Tatsache, dass unterschiedliche Restriktionsenzyme unterschiedliche genetische

Fingerabdrücke erzeugen und unvollständige enzymatische Verdauungen zu einer Überschätzung der Diversität führen können (OSBORN ET AL., 1999).

(A)RISA

Ähnlich der (T-)RFLP-Analyse werden bei der (A)utomatisierten R**ibosomalen** I**nter**genic S**pacer** A**nalyse** genetische Fingerabdrücke erstellt, jedoch in Unabhängigkeit von Restriktionsenzymen, sondern durch PCR-Amplifikation des „Intergenic Spacer“ (IGS; FISHER UND TRIPLETT, 1999). Zudem werden hier denaturierende Polyacrylamidgеле (RISA) oder eine Kapillarelektrophorese (ARISA) eingesetzt. Die Bandendetektion erfolgt entweder über Silberfärbung (RISA) oder automatische Sichtbarmachung des Fluoreszenz-markierten Vorwärtsprimers (ARISA). Diese Methode ist, speziell durch die Automatisierbarkeit, sehr gut reproduzierbar (FISHER UND TRIPLETT, 1999). Das dabei erhaltene Elektropherogramm gibt die unterschiedlichen Sequenzlängen des IGS wieder, sodass Unterschiede in der Zusammensetzung einer Pilzgemeinschaft detektiert werden können. Bei Pilzen weisen allerdings 69 % der IGS-Sequenzen eine IGS-Länge von 450 bis 550 bp auf, sodass eine Unterscheidung spezifischer Pilzspezies schwierig erscheint (RANJARD ET AL., 2001).

PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP)

Die ursprünglich von ORITA ET AL. (1989) für die Untersuchung von DNA-Polymorphismen oder -Punktmutationen entwickelte PCR-SSCP Methode stellt eine sequenzspezifische Auftrennung denaturierter DNA-Einzelstränge im nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel dar. Der Verdau der doppelsträngigen DNA (dsDNA) zu einem DNA-Einzelstrang (ssDNA) erfolgt mit Hilfe einer lambda-Exonuklease, deren Ansatzpunkt die Phosphorylierung des Reverse-Primers ist. Auch hier werden genetische Fingerabdrücke durch die Verwendung universeller Primer erstellt, indem die unterschiedlichen 3D-Strukturgrößen verschiedener Sequenzen unterschiedlich im Gel migrieren. Die Färbung erfolgt meist mittels Silbernitrat (BASSAM ET AL., 1991). Das Verfahren lieferte bei der Untersuchung von Bakterien- und Pilzgemeinschaften in unterschiedlichen Matrices wie Bodenproben, Hausstaub und Fleischproben bereits in vielen Studien aussagekräftige Ergebnisse (KUMEDA UND ASAO, 1996; SCHWIEGER UND TEBBE, 1998, PETERS ET AL., 2000; SCHMALENBERGER ET AL., 2001; KUMAR UND SHUKLA, 2004; KORTHALS ET AL., 2008A UND B; EGE ET AL., 2011; DORN-IN, 2012 UND 2013). Mit dieser Methode können große Mengen an Proben gleichzeitig, zuverlässig und schnell, basierend auf Unterschieden in ihrer primären DNA-

Sequenz (LEE ET AL., 1996), analysiert werden (KIRK ET AL., 2004). Ähnlich wie bei der DGGE-Analyse repräsentiert theoretisch eine Gelbande eine Pilzspezies. Allerdings können die einzelsträngigen DNA-Sequenzen mehrere stabile Konformationen, davon eine dominante, einnehmen (ORTÍ ET AL., 1997; SUNNUCKS ET AL., 2000). Dadurch kann sowohl eine Sequenz durch mehrere Banden im Polyacrylamidgel repräsentiert werden als auch eine Bande mehrere speziesspezifische Sequenzen beinhalten und damit in der Praxis eine Bande nicht immer eine Pilzspezies darstellen (TIEDJE ET AL., 1999). Zudem kann bereits ein Basenaustausch zu einer völlig anderen 3D-Struktur der einzelsträngigen DNA und, damit verbunden, zu einem anderen Laufverhalten im Gel führen (ORITA ET AL., 1989). NUNAN ET AL. (2005) und HONG ET AL. (2007) wiesen auf schlechte Reproduzierbarkeitswerte dieser Methode hin, was sich jedoch in der Studie von KORTHALS (2009) nicht bestätigte. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung des Ablaufs der PCR-SSCP-Analyse von Matratzenstaubproben der vorliegenden Studie.

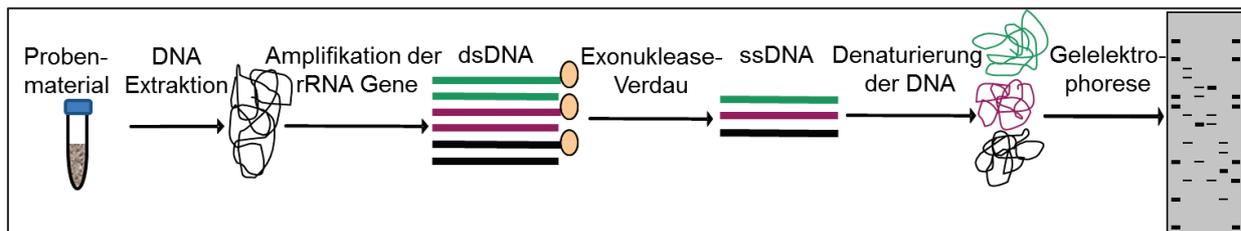


Abbildung 3: Schematische Darstellung der PCR-SSCP-Analyse

nach KORTHALS (2009) mit Modifikationen

2.2.3.2.4 Parallelsequenzierung

Der Begriff „Parallelsequenzierung“ beschreibt eine neue Generation von Sequenzierungstechnologien mit der Möglichkeit, unterschiedliche Sequenzen gleichzeitig zu ermitteln und damit einen hohen Durchsatz bei niedrigen Kosten zu garantieren. Die 1975/1977 von SANGER entwickelte und später angepasste Methode nach dem Prinzip des Dideoxy-Kettenabbruchs wird noch weiterhin angewendet, ist jedoch für eine große Probenanzahl sowie *de novo* Sequenzierungen nicht mehr die Technologie der Wahl (RONAGHI, 2001). Zahlreiche weitere Anwendungen wurden seitdem entwickelt, wie Sequenzierung durch Hybridisierung (BAINS UND SMITH, 1988; KHRAPKO ET AL., 1989), direkte Abbildung der DNA-Sequenz durch Atomkraftmikroskopie

(HANSMA ET AL., 1991), massenspektrometrische Auflösung (KÖSTER ET AL., 1996), verschiedene Verfahren basierend auf Ligation und Spaltung (KÖSTER ET AL., 1991; NYREN ET AL., 1993; BRENNER ET AL., 2000), Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese (WOOLEY UND MATHIES, 1995), Ionenhalbleiter-Sequenzierung (RUSK, 2011) und Pyrosequenzierung (RONAGHI ET AL., 1996 und 1998). Die neuesten Technologien und kommerziell erhältlichen Plattformen, welche hieraus entstanden sind und eine Parallelsequenzierung zulassen, werden unter dem Begriff „Next-Generation Sequencing“ zusammengefasst (VOELKERDING ET AL., 2009; RUSK, 2011). Dazu zählen die 454 Technologie (Roche/454 Life Sciences; Pyrosequenzierung), der Genome Analyzer (Illumina; Sequenzierung durch Ligation und Spaltung), die SOLiD™ Technologie (Applied Biosystems; Sequenzierung durch Ligation und Spaltung), die HeliScope™ Sequenzierung (Helicos Bioscience; Einzelmolekül-Sequenzierung ohne vorherige Amplifikation) und die Ion Torrent™ Technologie (Life Technologies; Ionenhalbleiter-Sequenzierung). Unter diesen verschiedenen Anwendungen zeigte bisher die 454 Applikation (MARGULIES ET AL., 2005) die besten Ergebnisse hinsichtlich der Sequenzqualität und der Leselänge von 500 bis 700 Basen je nach Gerätetyp (<http://454.com/products/index.asp>). Dies schien die anfängliche Vermutung zu bestätigen, dass der Einbau natürlicher Nukleotide effizienter ist als sich wiederholende Zyklen von Einbau, Detektion und Spaltung (ROTHBERG UND LEAMON, 2008).

Aus obigen Gründen wurde die Methode für diese Studie ausgewählt. Das Prinzip der Pyrosequenzierung geht auf MELAMEDE (1985) und HYMAN (1988) zurück und beschreibt die Messung von freier Pyrophosphat (PPi) bei Einbau eines Nukleotids durch die Polymerase während der DNA-Synthese. Dieses PPi wird durch eine Kaskade von Enzymreaktionen (Abbildung 4) in Licht umgewandelt, welches proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide ist. Das emittierte Licht wird mittels einer ladungsgekoppelten Kamera detektiert. Da jedes Nukleotid einzeln hinzugegeben wird, kann das Lichtsignal spezifisch einer Base zugeordnet werden. Bei Vorliegen mehrerer, identischer Basen in Folge steigt die Lichtintensität proportional an (RONAGHI, 2001).

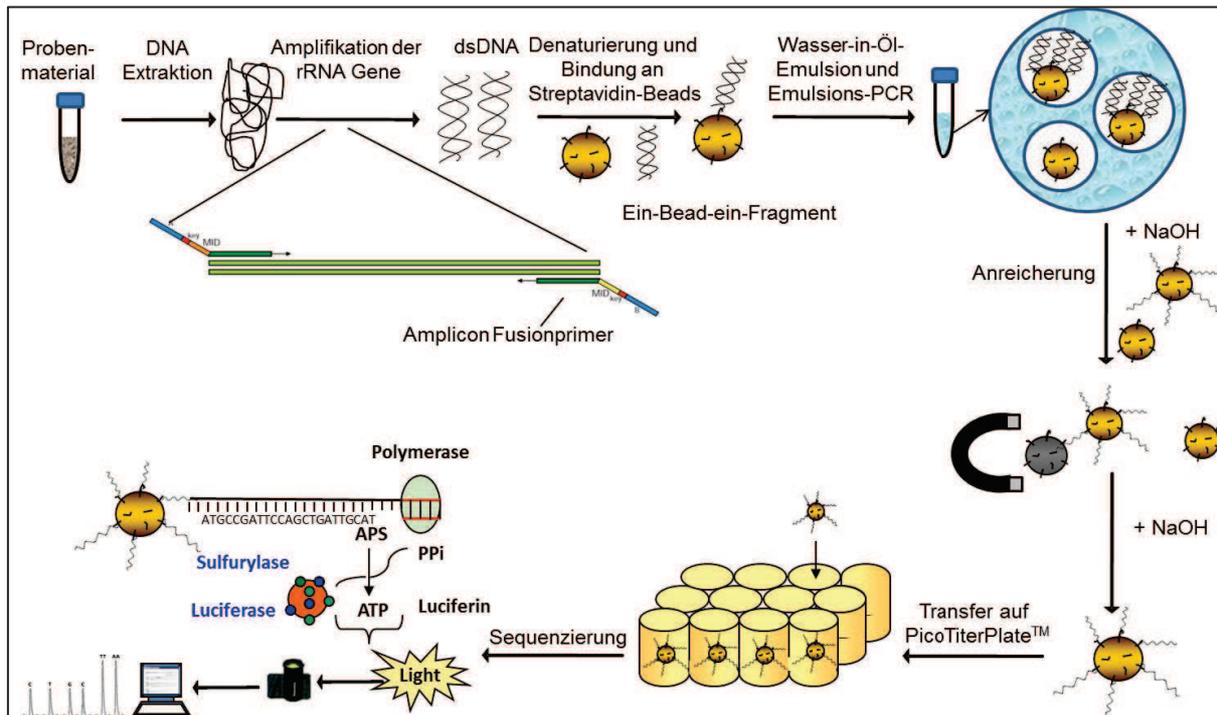


Abbildung 4: Darstellung des Ablaufs der 454 Pyrosequenzierung von spezifischen Amplikons; nach MARDIS (2008) mit leichten Modifikationen

Bei der 454 Technologie handelt es sich um eine Festphasen-Pyrosequenzierung mit DNA-Einzelsträngen an magnetischen Streptavidin-Beads auf einer PicoTiterPlate™ (RONAGHI ET AL., 1996; MARGULIES ET AL., 2005). Es werden zwei verschiedene Herangehensweisen – Gesamtgenom- („Shotgun“) und Amplikonansatz (PCR-Produkt) – unterschieden. Da in dieser Studie nur Amplikons sequenziert wurden, soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden. Der Ablauf gliedert sich jeweils in drei Abschnitte: 1. Herstellung der Probenbibliothek (PCR-Amplifikation mit speziellen „Amplicon Fusionprimer“ inklusive spezifischen Adaptoren für die Bead-Fragment-Kopplung und Aufreinigung), 2. Emulsions-PCR (Ein-Bead-ein-Fragment-Reaktion) und 3. Sequenzierung (ROTHBERG UND LEAMON, 2008). Der Ablauf der 454 Pyrosequenzierung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Mögliche Fehlerquellen sind eine Bindung mehrerer unterschiedlicher Fragmente an ein Bead, sodass durch die Kamera kein reines, Fragment-spezifisches Signal detektiert werden kann (HUSE ET AL., 2007). Außerdem können in jedem Zyklus leichte Veränderungen in der unvollständigen Synthese des Komplementärstrangs auftreten, wenn nicht alle Reagenzien nach jedem Zyklus vollständig entfernt werden (MARGULIES ET AL., 2005). Der häufigste Fehler ist jedoch eine Über- oder Unterschätzung der Länge von Homopolymeren (Abfolge mehrerer, identischer Basen) in Folge des Grenzwerts der

Lichtintensität, ab der ein Nukleotideinbau als gegeben angesehen wird. Dies führt zu Insertionen oder Deletionen von Basen, wodurch nicht die exakte Anzahl an identischen Basen durch das System erkannt wird (QUINLAN ET AL., 2008).

Die 454 Technologie ist momentan die am häufigsten genutzte Methode des „Next-Generation Sequencing“. Allein zwischen 2005 und 2008 wurde die ursprüngliche Beschreibung der Technologie (MARGULIES ET AL., 2005) knapp 600-mal zitiert und über 100 begutachtete Publikationen mit unterschiedlichsten Fragestellungen (u.a. Humangenetik, Metagenomik, Ökologie und Evolution) wurden veröffentlicht (ROTHBERG UND LEAMON, 2008). Vermehrt werden nun auch mikrobielle Diversitätsstudien publiziert (PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012). Inwieweit eine exakte Abbildung der tatsächlichen Diversität hinsichtlich einer quantitativen Aussage mit Hilfe der neuen Technologien möglich ist, wird derzeit noch diskutiert (AMEND ET AL., 2010A; PITKÄRANTA ET AL., 2011).

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im Folgenden werden die für die Methodenentwicklung und -validierung eingesetzten Pilzspezies, das Probenmaterial sowie die verwendeten technischen Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und die Herstellung der Gebrauchslösungen dargestellt und erläutert.

3.1.1 Pilzspezies

Zur Methodenentwicklung und -validierung wurden 38 Pilzspezies ausgewählt, die als häufige Vertreter in der Umwelt allgemein sowie in Staubproben im Speziellen – im Haus bzw. im Stall – bekannt sind (LUSTGRAAF, 1978; WASSENAAR, 1988; BEGUIN UND NOLARD, 1996; O'CONNOR ET AL., 2004; NORMAND ET AL., 2009; EGE ET AL., 2011; RINTALA ET AL., 2012). Die Isolate stammten von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) oder aus dem internen Stammkorb des Lehrstuhls für Tierhygiene der Technischen Universität München. Die verwendeten Spezies und deren Herkunft sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Reinheit und Identität des Genus/der Spezies wurden makroskopisch und mikroskopisch kontrolliert.

Tabelle 4: Zur Methodenentwicklung und -validierung eingesetzte Pilzarten

Pilzart	Stammnummer	Herkunft / Literatur
<i>Acremonium strictum</i>	DSM 3567	GAMS, 1971
<i>Alternaria</i> sp.	V9	Stammkorb, unbekannt
<i>Alternaria alternata</i>	DSM 1102	SAWAMURA, 1976
<i>Aspergillus clavatus</i>	A1	Stammkorb, Eigenisolat aus Futtermittel
<i>Aspergillus flavus</i>	A2	Stammkorb, unbekannt
<i>Aspergillus fumigatus</i>	A7	Stammkorb, Isolat aus Futtermittel
<i>Aspergillus glaucus</i>	A15	Stammkorb, Isolat aus Futtermittel
<i>Aspergillus niger</i>	A14	Stammkorb, Isolat aus Futtermittel
<i>Aspergillus versicolor</i>	A13	Stammkorb, Isolat aus Futtermittel
<i>Aspergillus versicolor</i>	DSM 1943	WICKLOW ET AL., 1981

Fortsetzung Tabelle 4: Zur Methodenentwicklung und –validierung eingesetzte Pilzarten

Pilzart	Stammnummer	Herkunft / Literatur
<i>Aureobasidium pullulans</i>	V4	Stammkorb, Isolat von Fensterrahmen
<i>Aureobasidium pullulans</i>	DSM 2404	KLAUSMEIER, 1972
<i>Chaetomium</i> sp.	V19	Stammkorb, Isolat aus Matratzenstaub
<i>Chrysonilia</i> sp.	V11	Stammkorb, Isolat aus Stallstaub
<i>Cladosporium</i> sp.	V8	Stammkorb, unbekannt
<i>Cladosporium herbarum</i>	DSM 63422	Isolat von Holztür, Deutschland
<i>Epicoccum</i> sp.	V18	Stammkorb, unbekannt
<i>Eurotium</i> sp.	A3	Stammkorb, Isolat aus Silage
<i>Eurotium amstelodami</i>	DSM 62629	Isolat von <i>Prunus armeniaca</i> , Spanien
<i>Eurotium chevalieri</i>	DSM 62630	Isolat von <i>Prunus armeniaca</i> , Spanien
<i>Eurotium rubrum</i>	DSM 62631	Isolat von <i>Prunus armeniaca</i> , Spanien
<i>Fusarium</i> sp.	F8	Stammkorb, Isolat aus Futtermittel
<i>Fusarium culmorum</i>	F7	Stammkorb, unbekannt
<i>Moniliella</i> sp.	V10	Stammkorb, Isolat aus Stallstaub
<i>Mucor spinosus</i>	M6	Stammkorb, unbekannt
<i>Penicillium brevicompactum</i>	P12	Stammkorb, unbekannt
<i>Penicillium chrysogenum</i>	P1	Stammkorb, Dissertation Prof. Bauer
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DSM 844	RAPER UND THOM, 1949
<i>Rhizopus peca</i>	M3	Stammkorb, unbekannt
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DSM 70451	MEYEN, 1838 (ohne Referenz)
<i>Stachybotrys</i> sp. Stamm I	S5	Stammkorb, Isolat von Tapete
<i>Stachybotrys</i> sp. Stamm II	S6	Stammkorb, Isolat von Rigips
<i>Stachybotrys chartarum</i> S1114	S7	Stammkorb, unbekannt
<i>Stachybotrys chartarum</i> S1495	S8	Stammkorb, unbekannt
<i>Trichoderma</i> sp.	V3	Stammkorb, Isolat aus Matratzenstaub
<i>Trichothecium roseum</i>	V6	Stammkorb, Isolat aus Stallluft
<i>Wallemia</i> sp.	W1	Stammkorb, Isolat aus Futtermittel
<i>Wallemia sebi</i>	DSM 5329	Isolat von Papiercontainer, Deutschland

3.1.2 Probenmaterial

Für das Forschungsvorhaben wurden Staubproben (Matratzen- und Stallstaub) als Probenmaterial verwendet. Für die Entwicklung und Validierung der Methoden wurden Matratzenstaubproben von Erwachsenen aus dem Raum München gesammelt und randomisiert gemischt. Je eine Hühnerstall- (Stallboden) und Schweinestallprobe (Fenstersims) stammten von der Versuchsstation Thalhausen der Technischen Universität München (TUM), eine Kuhstall- (Fenstersims) und drei Matratzenstaubproben vom Gut Achselschwang der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Die Probensammlung erfolgte mittels eines sterilen Spatels bei den Stallstaubproben und eines handelsüblichen Handstaubsaugers bei den Matratzenstaubproben (KORTHALS ET AL., 2008A; EGE ET AL., 2011).

Zur Bestimmung der Diversität der Pilzexposition bei Bauernhofkindern und zur Identifizierung von potenziell Asthma-protektiven und -induzierenden Schimmelpilzen wurde eine stratifizierte Stichprobe von 844 Matratzenstaubproben von Schulkindern, die an der europaweiten GABRIEL-Studie (Phase 3; GENUNEIT ET AL., 2011) teilnahmen, untersucht. Die Stichprobe stammte aus Bayern, Deutschland. Die Proben gehörten hierbei drei Strata sowie insgesamt sechs Teilgruppen (bezüglich Gesundheitsstatus) – davon vier Hauptgruppen – an (Abbildung 5). Der zugrundeliegende Gesundheitsstatus und die sozialen Bedingungen der Kinder wurden per Fragebogen unter Berücksichtigung ethischer Richtlinien erfasst. Bei der Studie handelte es sich um eine Blindstudie; die Herkunft der einzelnen Probe und der Gesundheitsstatus des betreffenden Kindes waren bei der Durchführung der Studie unbekannt und wurde erst im Rahmen der statistischen Auswertung offengelegt. Die Sammlung der Staubproben erfolgte nach einem bewährten Protokoll (SCHRAM-BIJKERK ET AL., 2005). Der Staub wurde anschließend in 50 und 100 mg Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

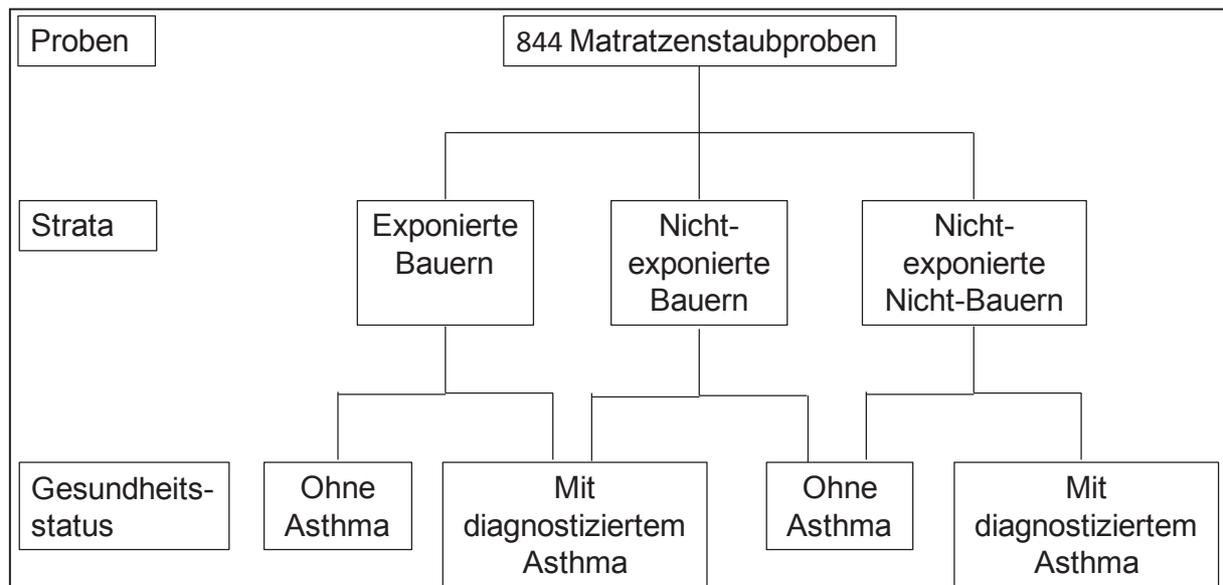


Abbildung 5: Übersicht des Hintergrunds der GABRIEL-Matratzenstaubproben bezüglich Quelle und Gesundheitsstatus der Schulkinder

3.1.3 Technische Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten, technischen Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Typ- / Kat.-Nummer
Abzug, extern belüftet	PRUTSCHER LABORATORY SYSTEMS
Abzug, intern belüftet	KENDRO, HS 12
Analysenwaage	SARTORIUS, R200D
Brutschrank	MEMMERT, U40
Elektrophoresekammer für Agarosegele	PEQLAB, 40-1214
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	PEQLAB, 45-2020-i
Färbewannen	HEILAND, 420-575
Finnpipette (1 – 5 mL)	VWR, 613-2520
Flockeis-Automat	SCOTSMAN, AF80
Homogenisator	IKA® Ultra Turrax® Tube Dispenser QIAGEN, Tissue Lyzer II, 85300

Fortsetzung Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten, technischen Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Typ- / Kat.-Nummer
Kälte-Umwälzthermostat	WITEG Labortechnik, Wise Circu
Laborschüttler	CARL ROTH, Probenröhrchen-Rotator Labquake, PL27.1
LightCycler, 96-well	ROCHE, LightCycler [®] 480
LightCycler, Glaskapillaren	ROCHE, LightCycler [®] 2.0
Magnetic Particle Concentrator	INVITROGEN, 123-21D
Magnetrührer, temperierbar	HEIDOLPH, MR3001K, 504-10100-00-1
Mikroskop	LEITZ, Aristoplan
Mikrozentrifuge	EPPENDORF MiniSpin
Mikrowelle	BAUKNECHT
Multipette	EPPENDORF, Multipette plus
Next Generation Sequencer	ROCHE, GS Junior [™]
Pipetten Eppendorf Research (0,5–10 µL; 10–100 µL; 100–1000 µL)	VWR (613-3583; 613-3585; 613-3587)
Scanner	AGFA, Arcus 1200
Schüttler	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., G10 Gryotory [®] Shaker
Software GelCompar [®] II	APPLIED MATHS
Spannungsgerät für Agarosegele	PEQLAB, EV 243
Spannungsgerät für Polyacrylamidgele	PEQLAB, EV 243
Spektrophotometer	PEQLAB, NanoDrop [®] ND-1000
Thermocycler	BIOMETRA, TRIO Thermoblock [™] , 9704043 TRIO Heated Lid, 9703033 BIOMETRA, T3000 Thermocycler, 2807237 APPLIED BIOSYSTEMS, ABI 2720 (96-well)
Thermomixer	EPPENDORF, Comfort 535502652
Tischzentrifuge	VWR, Galaxy 16 DH HETTICH, Mikro 200
Vakuumpumpe	KURT NEUBERGER KG, NV 25.3
Vortexer	Vortex Genie 2 Scientific Industries G-560 E
Vortexadapter	MOBIO, 13000-V1
Waage	OHAUS, Scout [™] PRO SPU402

Fortsetzung Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten, technischen Geräte

Bezeichnung	Hersteller, Typ- / Kat.-Nummer
Wasserbad	GFL, Typ1013, 10564598 I
Wellkamm für Agarosegele	PEQLAB, 40-1214-20D
Wellkamm für Polyacrylamidgele	eigene Schablone aus PTFE-Folie (0,4 mm);
Wonder wedge separation tool	NOVODIRECT, SE1514
Zentrifugen	HERMLE, Typ Z383 Nr. 30050017 HERAEUS, Biofuge 28RS

3.1.4 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 6 sind die Verbrauchsmaterialien alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 6: Übersicht über das verwendete Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller, Kat.-Nummer
96-well Platten, semi-skirted	EPPENDORF, 0030128575
96-well Platten, weiß, LightCycler® 480	ROCHE, 04729692001
AMPure XP 5 mL Kit	BECKMAN COULTER, A63880
Cap Stripes	PEQLAB, 82-0784-A
Combitips Plus (5 mL), steril	EPPENDORF, 0030069250
Einmalspritzen (20 mL)	VWR, 6120118
Filterpipettenspitzen (10 µL; 100 µL; 1000 µL)	SARSTEDT, 70.1115.410; 70.760.412; 70.762.411
GenElute™ PCR Clean-up Kit	SIGMA, NA1020-1KT
GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit	SIGMA, G2N70-1KT
Glaskapillaren, LightCycler® 2.0	ROCHE, 04929292001
Glass beads, 212 – 300 µm	SIGMA, G9143-500G
Glasplatte, 20x20 cm	Glaserei Kraml, Freising
Glasplatte, ausgeschnitten, 20x20 cm	PEQLAB, 45-2020-20R
GS Junior™ emPCR Kit (Lib-L)	ROCHE, 5996481001
GS Junior™ Maintenance Wash Kit	ROCHE, 5889111001

Fortsetzung Tabelle 6: Übersicht über das verwendete Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller, Kat.-Nummer
GS Junior™ Maintenance Wash Kit	ROCHE, 5889111001
GS Junior™ PicoTiterPlate™ Kit	ROCHE, 5996619001
GS Junior™ Sequencing Kit	ROCHE, 5996554001
Nitrilhandschuhe	GENAXXON, M6140.100M
Oligonucleotide, NGS	MWG OPERON
Oligonucleotide, PCR	METABION
Petrischalen	SARSTEDT, 82.1472
Pipettenspitzen, (1-5 mL)	VWR, 612-1484
PowerSoil™ DNA Isolation Kit	MOBIO Laboratories, Inc., 12888-50
PP-Teströhrchen (15 mL; 50 mL)	GREINER bio-one, 188271; 227261
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, 28704
Reaktionsgefäße (0,2 mL; 0,5 mL; 1,5 mL; 2,0 mL)	SARSTEDT, 72.991.002; 72.735.002; 72.690; 72.695
Skalpellklingen	Henry Schein, 7827702
Spritzenvorsatzfilter (steril)	ZEFA, Z.3210745
Untersuchungshandschuhe, Gr. M	VWR, 112-2361
Vernichtungsbeutel	SARSTEDT, 86.1197

3.1.5 Chemikalien

Im Folgenden (Tabelle 7) werden die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Kat.-Nummer
100 bp DNA ladder	NEB, N3231L
Agar-Agar	MERCK, 1.01614.1000
Ammoniumacetat	SIGMA, ,A1542
APS	ICN Biomedicals Inc., 802829
Bind Silane	APPLICHEM, A3797

Fortsetzung Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Kat.-Nummer
Borsäure	APPLICHEM, A3581.1000
Bromphenolblau	MERCK, 1.08122.0025
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)	SIGMA, C0549-1QT
Chlortetracyclin-HCl	ICN, 190327
CTAB	APPLICHEM, A6284.0100
DG18-Agarbasis	OXOID, CM729
dNTP-Mix	QIAGEN, 201901
EDTA	MERCK, 1.08454.0250
Essigsäure	VWR, 1.00063.2511
Ethanol	VWR, 1.00983.2511
Ethidiumbromid	SIGMA, E-8751
FastStart Hifi PCR System	ROCHE, 4738292001
FastStart SYBR Green Master	ROCHE, 04673484001
Ficoll 400	MERCK, 341691-250GM
Formaldehydlösung	SIGMA, F8775
Formamide	MERCK, 344206-L
GenAgarose LE	GENAXXON, M3044.0500
Glykogen	INVITROGEN, 10814-010
HCl	MERCK, 1.00319.1000
HotStarTaq DNA Polymerase	QIAGEN, 203203
Isopropanol, 100 %	VWR, 1.09634.2511
λ -Exonuklease	NEB, M0262S
LightCycler [®] FastStart DNA Master SYBR Green I	ROCHE, 03003230001
Lysozym	SIGMA, L-6876
Magnesiumacetat	SIGMA, M5661
MDE [®] Gel Solution	LONZA, 50620
NaCl	MERCK, 1.06400.1000
Na ₂ EDTA	MERCK, 1.08454.0250

Fortsetzung Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Kat.-Nummer
Na ₂ CO ₃	SIGMA, S7795
NaOH, 10 N	FISHER SCIENTIFIC, 10488790
Natriumthiosulfat	SIGMA, F7026
Nuklease-freies Wasser	PROMEGA, P1193
Penicillin / Streptomycin Sulfate	SIGMA, S-6501
Proteinase K	GENAXXON, M3036.0100
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay	INVITROGEN, P7589
Repel Silane	APPLICHEM, A0818
Sabouraud-2 % Glucose-Agar	MERCK, 1.07315.0500
SDS	SIGMA, L-4390-25G
Silbernitrat	SIGMA, S7276
TEMED	APPLICHEM, A1148.0100
Tris-Base	MERCK, 1.08382.2500
Triton-X 100	SIGMA, T-9234
Tween20, 100 %, flüssig	FISHER SCIENTIFIC, 10113103
Xylene Cyanol	SIGMA, X4126

3.1.6 Herstellung der Gebrauchsmedien

Für die Herstellung der Gebrauchsmedien wurden die Chemikalien aus Tabelle 7 verwendet. Die Zusammensetzung wird im Folgenden näher erläutert.

3.1.6.1 Nährmedien

DG18-Agar (Dichloran-Glycerin)

DG18-Agarbasis	31,5 g	OXOID, CM729
Agar-Agar	2,0 g	MERCK, 1.01614.1000
Glycerin	220,0 g	MERCK, 1.04092.2500

Ad 1 L bidest H₂O, autoklavieren

Zugabe von 10 mL Antibiotikum (200 g Chlortetracyclin-HCl (ICN, 190327), ad

100 mL bidest. H₂O

Sabouraud-2 %-Glucose-Agar

Sabouraud-2 %-Glucose-Agar	47 g	MERCK, 1.07315.0500
Agar-Agar	2 g	MERCK, 1.01614.1000
Ad 1 L bidest. H ₂ O, autoklavieren		
Zugabe von 10 mL Antibiotikum (2,395 g Penicillin G, 0,4 g Streptomycin Sulfate (SIGMA, S-6501), ad 100 mL bidest. H ₂ O), sterilfiltriert		

Spezifische Nährmedien der DSMZ (<http://www.dsmz.de>)

Haferflockenagar	DSMZ-Medium 189
Kartoffel-Dextrose-Agar	DSMZ-Medium 129
Medium für osmophile Pilze	DSMZ-Medium 187
Tomatensaft-Agar	DSMZ-Medium 310
Universales Hefemedium	DSMZ-Medium 186

3.1.6.2 Molekularbiologische Gebrauchslösungen1x TE-Puffer

Tris	10 mM	MERCK, 1.08382.2500
EDTA	1 mM	MERCK, 1.08454.0250
HCl (pH 8,0)		MERCK, 1.00319.1000
Ad 1 L bidest. H ₂ O, autoklavieren		

10x TBE für Agarose- und Polyacrylamidgele

Tris	108 g	MERCK, 1.08382.2500
Borsäure	55 g	APPLICHEM, A3581.1000
EDTA (pH 8,0) [0,5 M]	40 mL	MERCK, 1.08454.0250
Ad 1 L bidest. H ₂ O		

Bind-Silane-Lösung

Ethanol (96 %)	10 mL	VWR, 1.00983.2511
Essigsäure (96 %)	100 µL	VWR, 1.00063.2511
Bind Silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan)	100 µL	APPLICHEM, A3797

“Crush and Soak”-Puffer zur Elution der DNA aus dem Polyacrylamidgel

Ammoniumacetat	0,5 M	SIGMA, A1542
Magnesiumacetat	10 mM	SIGMA, M5661
Na ₂ EDTA	1 mM	MERCK, 1.08454.0250
SDS	0,1 %	SIGMA, L-4390-25G

0,2 M CTAB – 0,5 M NaCl für DNA-Extraktion (CTAB-NaCl)

CTAB	3,6446 g	APPLICHEM, A6284.0100
NaCl	1,461 g	MERCK, 1.06400.1000
Ad 50 mL bidest. H ₂ O		

Entwicklerlösung für SSCP-Gele

Na ₂ CO ₃	33,75 g	SIGMA, S7795
Formaldehydlösung, 37 %	1,2 mL	SIGMA, F8775
Natriumthiosulfat, 0,2 %	600 µL	SIGMA, F7026
bidest. H ₂ O	600 mL	

Färbelösung für SSCP-Gele

AgNO ₃	0,5 g	SIGMA, S7276
Formaldehydlösung, 37 %	750 µL	SIGMA, F8775
bidest. H ₂ O	500 mL	

Ladepuffer für Agarosegele

Ficoll 400	2,5 g	MERCK, 341691-250GM
Na ₂ EDTA	0,5 mL	MERCK, 1.08454.0250
Bromphenolblau, 4 %	0,25 mL	MERCK, 1.08122.0025
Ad 10 mL bidest. H ₂ O		

Ladepuffer für SSCP-Gele

NaOH	0,04 g	MERCK, 1.06498.1000
Xylene Cyanol	0,25 g	SIGMA, X4126
Bromphenolblau	0,25 g	MERCK, 1.08122.0025
Formamid	95 mL	MERCK, 344206-1L
bidest. H ₂ O	5 mL	

SSCP-Polyacrylamidgellösung

	MDE-Konzentration			
	31,2 %	35,0 %	40,0 %	45,0 %
bidest. H ₂ O	14,7 mL	13,75 mL	12,5 mL	11,25 mL
10x TBE	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
2x MDE	7,8 mL	8,75 mL	10,0 mL	11,25 mL
TEMED	24 µL	24 µL	24 µL	24 µL
40%iges APS	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Anzucht der Pilzstämmen

Alle Stammkorbspezies (Lehrstuhl für Tierhygiene, TUM; Tabelle 4) wurden durch Inokulation für mindestens sieben Tage bis zur Sporulation auf Sabouraud-2 % Glucose-Agar (SABOURAUD, 1892; ODDS, 1991) kultiviert. Verschiedene *Wallemia* spp. wurden auf DG18-Agar (HOCKING UND PITT, 1980) angezüchtet; für die DSMZ-Stämme wurde das empfohlene Medium verwendet. Nach Aufnahme der DSMZ-Stämme in die Stammsammlung des Lehrstuhls für Tierhygiene (Kultur auf Sabouraud-2 % Glucose-Agar) wurden diese wie die Stammkorbspezies behandelt. Die Medienzusammensetzung für Sabouraud-2 % Glucose-Agar und DG18-Agar ist unter Punkt 3.1.6.1 beschrieben. Für die Referenzstämmen DSM 1943 / DSM 2404 / DSM 63422 und DSM 844 (für Pilzbezeichnung s. Tabelle 4) wurde Kartoffel-Dextrose-Agar (DSMZ-Medium 129), für DSM 70451 Universales Hefemedium (DSMZ-Medium 186), für DSM 62629 / DSM 62630 / DSM 62631 und DSM 5329 das Medium für osmophile Pilze (DSMZ-Medium 187), für DSM 3567 Haferflocken-Agar (DSMZ-Medium 189) sowie für DSM 1102 Tomatensaft-Agar (DSMZ-Medium 310) verwendet.

Die Pilze wurden unter Zugabe von 5 mL sterilem Wasser mit Hilfe eines Dri-galskispatels abgenommen und die, neben Hyphenbestandteilen, überwiegend aus Sporen bestehenden Suspensionen bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Einstellung der Sporendichte

Die Sporenkonzentration wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und die Sporendichte mittels einer Verdünnungsreihe eingestellt. Hyphenbestandteile in der Sporensuspension wurden nicht berücksichtigt. Die genauen Sporenkonzentrationen sind in der jeweiligen Versuchsbeschreibung aufgeführt.

3.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Polymerase-Chain-Reaction-Single-Strand-Conformation-Polymorphism (PCR-SSCP) Basismethode

Zur Untersuchung von Pilzgemeinschaften auf Gattungs- bzw. Spezieesebene wurde das PCR-SSCP-Verfahren angewendet. Dabei wird im Prinzip wie folgt vorgegangen:

1. Extraktion der DNA aus dem Probenmaterial
2. Amplifikation eines Pilz-spezifischen DNA-Abschnitts (18S rDNA, 28S rDNA, ITS Region) mit „Universalprimern“; der Reverse-Primer wird hierbei mit einer 5'-Phosphorylierung versehen
3. Überprüfung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese
4. Aufreinigung der PCR-Produkte
5. Quantifizierung der DNA-Konzentration
6. Verdau des Phosphat-markierten DNA-Strangs mit Hilfe einer λ -Exonuklease
7. Aufreinigung der einzelsträngigen DNA
8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur größenabhängigen Trennung der DNA-Einzelstrang-Strukturen (nach Denaturierung und Renaturierung der einzelsträngigen DNA in eine dreidimensionale Struktur)
9. Färbung der Banden mit Silbernitrat
10. Auswertung der Bandenprofile mit Hilfe der GelCompar[®] II Software
11. Aufreinigung ausgewählter Banden aus dem Polyacrylamidgel („Crush and Soak“), Sequenzierung der DNA und Abgleich der Sequenziererergebnisse mit Datenbankeinträgen

3.2.2.1.1 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der DNA aus Reinkulturen und der Matrix Staub wurden zwei kommerziell erhältliche Kits – der PowerSoil[™] DNA Isolation Kit (MOBIO) und der GenElute[™] Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA) – sowie parallel dazu das CTAB-Extraktionsverfahren (Cetyltrimethylammoniumbromid) vergleichend ange-

wendet (Tabelle 8). Für die Methodenentwicklung und -validierung wurden die kommerziellen Verfahren dabei gemäß den Herstellerangaben mit 500 µL Sporensuspension durchgeführt. Im Vorfeld der GenElute™ Extraktion wurde die Sporenzellwand durch Zugabe von 0,5 g Glass beads (Durchmesser: 212-300 µM; SIGMA) und durch Schütteln für 1 min bei 30 Hz (Tissue Lyzer II, QIAGEN) destabilisiert. Die CTAB-Methode wurde gemäß KORTHALS ET AL., 2008A, mit wenigen Modifikationen angewandt: nach Zentrifugation von 500 µL Sporensuspension bei 10.000 x g für 10 min wurde das Pellet in 500 µL TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und im Anschluss analog zur GenElute™ Methode die Zellwand vorab mittels Glass beads aufgeschlossen.

Im Rahmen der Durchführung der Endmethode mit der Matrix Staub wurden 50 mg der jeweiligen Staubprobe für die DNA-Extraktion (s. Punkt 3.2.3.2.3) verwendet. Waren bei Matratzenstaubproben der GABRIEL-Studie weniger als 50 mg Probenmaterial vorhanden, wurde die gesamte zur Verfügung stehende Menge eingesetzt.

Die detaillierten Extraktionsprotokolle sind den Flussdiagrammen im Anhang B1 zu entnehmen. Die DNA-Extrakte wurden bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: Angewandte DNA-Extraktionsverfahren

Extraktions- verfahren	Anwendung für			
	Reinkulturen	Methoden- entwicklung	Methoden- validierung	Durchführung Endmethode
PowerSoil™ DNA Isolation Kit	+	+	+	+
GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit	+	+	+	-
CTAB-Methode	+	+	+	-

3.2.2.1.2 PCR

Die Amplifikation der DNA-Extrakte erfolgte in zwei Thermocyclern der Firma BIOMETRA. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist in Tabelle 9 dargestellt. Für Untersuchungen der Amplifizierbarkeit von Pilzreinkulturen (Einfachansatz) wurde

ein Ansatzgesamtvolumen von 25 μL verwendet; für Sequenzier Vorbereitungen sowie PCR-SSCP-Analyse wurde ein Reaktionsgesamtvolumen je Probe von 150 μL (50 μL -Dreifachansatz) eingesetzt. Je PCR-Lauf wurden eine Positivkontrolle (DNA-Extrakt einer Pilzreinkultur) und eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser anstatt eines DNA-Templates) eingesetzt. Die verwendeten Primer und die exakten PCR-Bedingungen sind in den jeweiligen Versuchsbeschreibungen aufgeführt.

Tabelle 9: Reagenzien pro PCR-Ansatz

Reagenzien	Menge [μL]	Menge [μL]
Nuklease-freies Wasser	20,88	41,75
10x Puffer inkl. 15 mM MgCl_2	2,5	5,0
dNTPs [je 10 mM]	0,5	1,0
Primer 1 [50 μM]	0,25	0,5
Primer 2 [50 μM]	0,25	0,5
HotStarTaq DNA Polymerase [5 U/ μL]	0,125	0,25
DNA-Template	0,5	1,0
Gesamtvolumen	25 μL	50 μL

3.2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel in 0,5 x TBE-Puffer und mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert.

3.2.2.1.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Entfernung von überschüssigen Primern und Verunreinigungen wurden die Amplifikate mittels GenEluteTM PCR Clean-up Kit (SIGMA) nach Herstellerangaben gereinigt. Das Protokoll ist im Anhang B2 dargestellt. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.2.1.5 Quantifizierung der DNA-Konzentration

Die Quantifizierung der DNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop[®] ND-1000 Spektrophotometer durchgeführt. Die Proben wurden im Anschluss auf eine einheit-

liche DNA-Menge von 400 ng in 26 μL Gesamtvolumen eingestellt und bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2.1.6 λ -Exonuklease-Verdau

Um DNA-Einzelstränge zu erhalten, wurde der phosphorylierte DNA-Strang mittels einer λ -Exonuklease „verdaut“. Die Zusammensetzung des Ansatzes je Probe (40 μL) ist Tabelle 10 zu entnehmen. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 45 min.

Tabelle 10: Reagenzien für λ -Exonuklease-Verdau pro Ansatz

Reagenzien	Menge [μL]
Nuklease-freies Wasser	9,5
λ -Exonuklease-Puffer, 10x	4,0
λ -Exonuklease [5 U/ μL]	0,5
PCR-Produkt [400 ng]	26,0
Gesamtvolumen	40 μL

3.2.2.1.7 Aufreinigung der Einzelstrang-DNA

Zum Abbruch des λ -Exonuklease-Verdau und zur Entfernung der Exonuklease wurde der GenEluteTM PCR Clean-up Kit (SIGMA) nach Herstellerangaben mit leichten Modifikationen (DNA-Elution mit 20 μL Elutionspuffer) verwendet. Das Protokoll ist im Anhang B2 dargestellt. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.2.2.1.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur sequenzabhängigen Trennung der DNA-Einzelstränge wurde eine vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem PerfectBlue Dual Gel System Twin L (PEQLAB) mit 0,4 mm Spacern und Kämmen (20 Zähne) durchgeführt. Die Bestandteile des nativen (nicht-denaturierenden) Polyacrylamidgels waren bidest. H_2O , 10-fach-konzentrierter TBE-Puffer und 2-fach-konzentrierte Mutation-Detection-Enhancement-Lösung (MDE). Nach Sterilfiltration der drei Komponenten mit einem 0,45 μm Sterilfilter wurden anschließend Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 40%iges Ammoniumpersulfat (APS) für die Polymerisation hinzugegeben. Da durch

eine Variation der Reagenzien die Trennleistung des Gels beeinflusst wird, sind die jeweiligen Mengenangaben in der speziellen Versuchsbeschreibung aufgeführt. Die Trennung der DNA-Einzelstränge erfolgte bei einer Spannung von 400 V und einer kontrollierten Temperatur von 20°C. Die Dauer der elektrophoretischen Trennung wurde während der Methodenentwicklung evaluiert; deshalb sind die Variationen in der jeweiligen Versuchsbeschreibung dargestellt.

Die gereinigten DNA-Einzelstränge (400 ng DNA) wurden gemäß DOHRMANN UND TEBBE (2004) und KORTHALS ET AL. (2008A) mit leichten Modifikationen eingesetzt. Das 20 µL-Eluat aus der Reinigung (s. Punkt 3.2.2.1.7) wurde mit 9,0 µL SSCP Ladungspuffer versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und anschließend für die Renaturierung für 10 min auf Eis gestellt. 8,0 µL wurden schließlich je Geltasche aufgetragen. Als Laufweitenkontrolle wurde ein „Speziesstandard“ aus mehreren unterschiedlichen Pilzspezies eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung des „Speziesstandards“ wird später in Punkt 3.2.3.3 erklärt.

3.2.2.1.9 Silbernitrat-Färbung

Die Färbung des Polyacrylamidgels wurde nach BASSAM ET AL. (1991) mit geringen Modifikationen durchgeführt. Das Gel wurde hierfür auf der „Trägerglasplatte“ belassen und nur die „Deckglasplatte“ abgelöst. Das Gel wurde zunächst für 30 min bei 100 rpm in 500 mL Essigsäure (10 %) geschwenkt und anschließend die Essigsäure durch 3-maliges Waschen á 7 min mit bidest. H₂O entfernt. Im Anschluss wurde das Gel für 30 min in 500 mL Silbernitrat-Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Die Silbernitrat-Lösung wurde abgeschüttet und die Überreste durch erneutes Spülen mit bidest. H₂O (ca. 20 s) entfernt. Die Entwicklung wurde mit 600 mL Entwicklerlösung vorgenommen; die Färbedauer war abhängig von der Intensität der Banden, betrug jedoch in der Regel ca. 2,5 min. Der Färbevorgang wurde durch eine 4-minütige Inkubation des Gels in 500 mL Essigsäure (10 %) gestoppt. Zur Entfernung der Essigsäure wurde das Gel anschließend für 30 min in bidest. H₂O gelegt und danach für 24 h bei RT (ca. 22°C) getrocknet. Die gefärbten Gele wurden in luftdichter Plastikfolie im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.2.1.10 Digitale Auswertung der Elektropherogramme

Für die digitale Analyse wurde das SSCP-Elektropherogramm mittels eines Agfa Arcus 1200 Scanners digitalisiert. Die Auswertung der Banden erfolgte mit der Software GelCompar[®] II (APPLIED MATHS), MS Excel und anschließender Biostatistik mit der Software R 2.14.2.

Zur Bestimmung von Bandenprofilähnlichkeiten mittels GelCompar[®] II innerhalb und zwischen unterschiedlichen Polyacrylamidgelen wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient (%) in Clusteranalysen angewendet. Für Gel-zu-Gel-Vergleiche (Normalisierung) wurde als Laufweitenkontrolle ein Speziestandard, bestehend aus mehreren Referenzstamm-Reinkultur-Einzelstrang-Sequenzen, eingesetzt. Die Übersetzung der Bandeninformationen in quantitative Messwerte erfolgte mittels Auslesung von arbiträren, densitometrischen Werten (Dichtewerte) eines jeden SSCP-Profiles sowie durch die automatische Detektion von Banden (Bandmatching) durch die Software und Auslesung der Bandenintensitäten.

Die genauen Auswertungsparameter sind in der jeweiligen Versuchsbeschreibung dargestellt.

3.2.2.1.11 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und ausgewählten PCR-SSCP-Banden wurde bei der SEQUIERVE GmbH (Deutschland) nach dem Prinzip der Sanger-Sequenzierung (SANGER UND COULSON, 1975; SANGER ET AL., 1977) durchgeführt. Die Proben wurden hierfür folgendermaßen vorbereitet: PCR-Produkte wurden mittels GenElute[™] PCR Clean-up Kit (SIGMA) direkt oder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aus einem Agarosegel aufgereinigt, quantifiziert und eingeschickt. PCR-SSCP-Banden wurden vorsichtig mit einem DNA-freien Skalpell aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe der „Crush and Soak“-Methode (PETERS ET AL., 2000) zurückgewonnen. Der genaue Ablauf der Methode ist in Anhang B2 dargestellt. Die DNA wurde daraufhin reamplifiziert, die PCR-Produkte wie oben beschrieben gereinigt, quantifiziert und eingeschickt. Bei heterogenen Proben der PCR-SSCP-Analyse (verschiedene Sequenzen innerhalb einer Polyacrylamidgelbande) wurde durch die SEQUIERVE GmbH die Hauptsequenz je Probe editiert. Die Sequenzierergebnisse wurden mit Datenbanken – NCBI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und CBS-KNAW (<http://www.cbs.knaw.nl/>) – abgeglichen. Identifi-

kation auf Speziesebene wurde angenommen, sobald in einer der beiden Datenbanken eine sichere Bestimmung möglich war.

3.2.2.2 Parallelsequenzierung Basismethode

Für die Parallelsequenzierung („Next Generation Sequencing“/„ultra-deep sequencing“/„454 pyrosequencing“) von pilzgemeinschaftlicher DNA aus Staub stand ein GS Junior System (ROCHE) zur Verfügung. Die Probenvorbereitung und die Sequenzierung folgten der „Amplicon Pipeline“; es wurden zunächst mittels PCR Pilz-spezifische Amplikons generiert und diese schließlich in die Vorbereitung und Sequenzierung der Proben übernommen. Die Proben wurden gemäß den Herstelleranleitungen – *454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design* (März 2012), *Amplicon Library Preparation Manual* (März 2012), *emPCR Amplification Method Manual Lib-L* (März 2012) und *Sequencing Method Manual* (März 2012) – mit geringen Modifikationen präpariert. Die Quantifizierung der Probenbibliothek erfolgte in einem LightCycler® 480 (ROCHE) mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs PicoGreen (INVITROGEN). Da hierfür das Maximalvolumen für die Fluoreszenzfarbstoff-DNA-Mischung 100 µL betrug, musste der Quantifizierungs-DNA-Standard angepasst werden. Statt 100 bis 1,56 ng/well wurden 50 bis 0,78 ng/well DNA-Standard eingesetzt. Zur Entfernung von kurzen Fragmenten (v.a. Primerdimere) wurde das *Short Fragment Removal Procedure for the Amplicon Library Preparation Procedure* (TCB-2011-007, Januar 2012) mit einem DNA:Bead-Verhältnis von 1,8:1 angewendet. Bei Einsatz von Fragmenten mit einer Größe von über 500 bp, wurden, gemäß den o.g. *Guidelines for Amplicon Experimental Design*, der Reaktionsmix und das Amplifikationsprotokoll der emPCR für lange Fragmente angepasst. Die Barcode-Sequenzen (Multiplex Identifier Sequenzen; MID) wurden dem Technischem Bulletin (TCB) Nr. 005-2009 *Using Multiplex Identifier (MID) Adaptors for the GS FLX Titanium Chemistry – Extended MID Set* entnommen. Eine ausführliche Beschreibung der Probenvorbereitung ist in Anhang B3 dargestellt. Die verwendeten Primer und Anpassungen der Basismethode sind bei der Versuchsbeschreibung aufgeführt.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der MS Excel Anwendung ‚Teilergebnis‘, um 100%ig übereinstimmende Sequenzen zu clustern, sowie mit den Anwendungen QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology, CAPORASO ET AL., 2010) und UCLUST (EDGAR, 2010). Das Clustering mit QIIME und UCLUST wurde mit freund-

licher Unterstützung von Dr. Antje Legatzki, Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius durchgeführt. Hierfür wurden die Sequenzen zunächst gefiltert. Sequenzen mit weniger als 200 und mehr als 1000 Nukleotiden (nt) wurden ausgeschlossen. Die maximale Anzahl an nicht eindeutigen Basen und die maximale Länge von Homopolymeren wurden auf 6 gesetzt sowie keine Fehler in der Primersequenz und maximal 1,5 Fehler in der Barcode-Sequenz zugelassen. Anschließend wurden die Sequenzen mit der Anwendung UCLUST in QIIME zusammengefasst. Sequenzen mit mindestens 97 % Übereinstimmung wurden dabei zu einer sogenannten Operating Taxonomic Unit (OTUs) zusammengefügt. Die repräsentative, d. h. häufigste, Sequenz jeder OTU wurde ausgewählt und mit den Datenbankeinträgen von NCBI-BLAST und CBS-KNAW verglichen.

3.2.3 Adaption der Basismethoden an die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in der Matrix Staub

3.2.3.1 Evaluierung eines geeigneten Primerpaares

Zur Ermittlung eines geeigneten Primerpaares für die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Stall- und Hausstaubproben wurden insgesamt sechs Primerkombinationen miteinander verglichen. Informationen zu den Primern sind in Tabelle 11 aufgeführt. Sie amplifizieren Teile der konservierten 18S oder 28S rDNA sowie die sogenannte hochvariable ITS-Region (internal transcribed spacer) zwischen der 18S und 28S rDNA einschließlich der 5,8S rDNA. Die Primerkombinationen wurden bereits in bisherigen Studien für Pilzgemeinschaftsanalysen eingesetzt, jedoch hierbei in der Regel separat und nicht vergleichend (WHITE ET AL., 1990; GARDES UND BRUNS, 1993; SANDHU ET AL., 1995; KUMEDA UND ASAO, 1996; BORNEMAN UND HARTIN, 2000; WU ET AL., 2002; ANDERSON ET AL., 2003; BRODIE ET AL., 2003; ANDERSON UND CAIRNEY, 2004; KUMAR UND SHUKLA, 2005; PITKÄRANTA ET AL., 2008; ZACHOW ET AL., 2009).

Tabelle 11: Ausgewählte Primerkombinationen

Nr.	Primer	Sequenz	Ziel-region	Produkt-größe [bp]	Annealing-Temp. [°C]	Referenz
1	0817	TTAGCATGGAATAATRRRAATAGGA	18S	762	56	BORNEMAN UND HARTIN, 2000
	1536	ATTGCAATGCYCTATCCCCA				
2	NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	18S	377	50	WHITE ET AL., 1990
	NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA				
3	U1	GTGAAATTGTTGAAAGGGAA	28S	260	50	SANDHU ET AL., 1995
	U2	GACTCCTTGGTCCGTGTT				
4	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	570-590	62	WHITE ET AL., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC				
5	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS	600-630	60	GARDES UND BRUNS, 1993
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC				
6	Fun18sf	TTGCTCTCAACGAGGAAT	ITS	770-800	50	PITKÄRANTA ET AL., 2008
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC				

Zur Ermöglichung der Evaluierung der Primerpaare wurden vier verschiedene Versuche durchgeführt und vergleichend ausgewertet:

1. Amplifikation von Pilz-Reinkulturen (s. Punkt 3.2.3.1.1)
2. Auftrennung von Reinkultur-Einzelstrang-DNA im Polyacrylamidgel (s. Punkt 3.2.3.1.2)
3. Detektion von zusätzlichen Banden im Polyacrylamidgel (s. Punkt 3.2.3.1.3)
4. Identifikation von Referenzstämmen nach Sanger-Sequenzierung auf Speziesebene (s. Punkt 3.2.3.1.4)

3.2.3.1.1 DNA-Amplifikation von Pilzreinkulturen in Abhängigkeit des Primerpaares

38 Pilzspezies (Tabelle 4) wurden jeweils in Reinkultur eingesetzt und die DNA mit den drei unter Punkt 3.2.2.1.1 beschriebenen DNA-Extraktionsmethoden isoliert. Die Reinkultur-DNA wurde mit den Primern aus Tabelle 11 amplifiziert (PCR-Ansatz: s. Punkt 3.2.2.1.2) und anschließend gemäß Punkt 3.2.2.1.3 visualisiert. Die genauen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: PCR-Protokolle für die Amplifikation Pilz-spezifischer DNA

Primerpaar*	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Anzahl Zyklen	Terminale Elongation
1			56°C, 60 s		35	
2			50°C, 60 s		35	
3	95°C, 15 min	95°C, 45 s	50°C, 60 s	72°C, 60 s	30	72°C,
4			62°C, 60 s		36	10 min
5			60°C, 60 s		35	
6		96°C, 30 s	50°C, 45 s	72°C, 3 min	6	
		96°C, 30 s	50°C, 45 s	72°C, 60 s	19	

*Für Primerpaar-Nummern siehe Tabelle 11.

3.2.3.1.2 Auftrennung von Reinkultur-Einzelstrang-DNA im Polyacrylamidgel in Abhängigkeit des gewählten Primerpaares

Die Proben wurden gemäß 3.2.2.1.1 bis einschließlich 3.2.2.1.7 vorbereitet und die PCR-SSCP-Analyse gemäß den Punkten 3.2.2.1.8 und 3.2.2.1.9 durchgeführt. Für die Gewinnung der DNA wurde aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche (s. Punkt 4.1.2) ausschließlich der PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) verwendet. Die optimalen SSCP-Bedingungen wurden mit sieben phylogenetisch unterschiedlichen Pilzspezies aus der Lehrstuhl-internen Stammsammlung (s.a. Tabelle 4) – *Wallemia* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* spp., *Mucor spinosus*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus glaucus* Gruppe – evaluiert und die Auftrennung in Abhängigkeit des Primerpaares verglichen. Die ausgewählten Spezies sind häufig in Stall- und Matratzenstaubproben anzutreffen (LUSTGRAAF, 1978; WASSENAAR, 1988; BEGUIN UND NOLARD, 1996; O’CONNOR ET AL., 2004; NORMAND ET AL., 2009; EGE ET AL., 2011; RINTALA ET AL., 2012). Die Primer-abhängigen SSCP-Bedingungen sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Amplifikatlänge und SSCP-Bedingungen in Abhängigkeit des Primerpaares

Primerpaar*	PCR-Produkt [bp]	MDE-Konzentration [%]	Laufzeit [h]
1	762	31,2	24
2	377	40,0	24
3	260	45,0	20
4	570-590	31,2	24
5	600-630	31,2	24
6	770-800	31,2	24

*Für Primerpaar-Nummern siehe Tabelle 11.

3.2.3.1.3 Zusätzliche Banden im Polyacrylamidgel in Abhängigkeit des Primerpaares

Die Polyacrylamidgele aus Punkt 3.2.3.1.2 wurden hinsichtlich des Auftretens von multiplen Banden untersucht. Die zusätzlichen Banden in Abhängigkeit des Primerpaares wurden makroskopisch ausgezählt.

3.2.3.1.4 Möglichkeit der Bestimmung auf Speziesebene in Abhängigkeit des Primerpaares

Fünf Referenzstämme (s. Tabelle 4) – *Aspergillus versicolor* (DSM 1943), *Cladosporium herbarum* (DSM 63422), *Eurotium amstelodami* (DSM 62629), *Penicillium chrysogenum* (DSM 844) und *Wallemia sebi* (DSM 5329) – wurden für die Evaluierung der Möglichkeit der Identifikation auf Speziesebene nach PCR Amplifikation und Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Die Probenvorbereitung erfolgte gemäß den Punkten 3.2.3.1.1 und 3.2.2.1.11.

3.2.3.1.5 Evaluierung des geeigneten Primerpaares

Zur Ermöglichung der objektiven Evaluierung und der Bestimmung des am besten geeigneten Primerpaares wurde ein Notensystem (Tabelle 14) entwickelt, welches die Ergebnisse aus 3.2.3.1.1 bis 3.2.3.1.4 berücksichtigt. Die einzelnen Versuche wurden in Bezug auf deren Bedeutung für das aktuelle Forschungsvorhaben gewichtet: Identifikation von Referenzstämmen auf Speziesebene (50 %), zusätzliche Banden im Polyacrylamidgel (20 %), Auftrennung von Pilzspezies unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen im Polyacrylamidgel (20 %) und DNA-Amplifikation ausgewählter Pilz-Genera und -Spezies mittels PCR (10 %). Die Benotung richtete sich nach dem deutschen Schulnotensystem mit 1,0 als beste und 6,0 als schlechteste Note. Für den Sequenzierungsversuch wurden Noten von 1,0 (fünfmalige Identifikation auf Speziesebene möglich) bis 6,0 (keine Identifikation auf Speziesebene möglich) vergeben. Die restlichen Versuche wurden mit 1,0 bis 4,0 bewertet und wie in Tabelle 14 dargestellt bestimmt. Die Evaluierung der Amplifikation von Pilz-Reinkulturen mittels PCR wurde anhand der Anzahl amplifizierter Pilz-Genera und -Spezies ausgewertet. Eine maximale Punktzahl von 114 konnte erreicht werden (38 eingesetzte Reinkulturen x drei DNA-Extraktionsmethoden; s. Punkt 3.2.2.1.1). Die Amplifikation von mindestens 50 % (57) der eingesetzten Proben wurde mit der Note 4,0 bewertet. Die Vergabe von ganzen und halben Noten zwischen 57 und 114 erreichbaren Punkten erfolgte in gleichmäßigen Abständen (Tabelle 14). Gemäß der Gewichtung wurde eine Durchschnittsnote je Primerpaar berechnet.

In einem zweiten Schritt wurden die Ergebnisse aus 3.2.3.1.1 bis 3.2.3.1.4 einem Rangfolgetest unterzogen und der (Gesamt-) Rang gemäß o.g. Gewichtung der Einzelergebnisse ermittelt.

Das Primerpaar mit der besten Durchschnittsnote und dem niedrigsten Wert beim Rangfolgetest wurde für die folgenden Versuche verwendet.

Tabelle 14: Notensystem zur objektiven Evaluierung von universellen Pilz-Primern

Note	Identifikation auf Spezies-ebene [50 %]	Anzahl zusätzlicher Banden im Polyacrylamidgel [20 %]	Auftrennung im Polyacrylamidgel [20 %]	Amplifikation von Rein-kulturen [10 %]
1,0	5 von 5	1 bis 20	sehr gut	1,0: 114 - 107; 1,5: 106 - 99
2,0	4 von 5	21 bis 40	gut	2,0: 98 - 91; 2,5: 90 - 83
3,0	3 von 5	41 bis 60	ungenügend	3,0: 82 - 75; 3,5: 74 - 67
4,0	2 von 5	61 bis 80	keine	4,0: 66 - 57; 4,5: 56 - 50
5,0	1 von 5	k.N.	k.N.	k.N.
6,0	0 von 5	k.N.	k.N.	k.N.

[Gewichtung] der einzelnen Versuche in Klammern. k.N.: keine Notenvergabe.

3.2.3.2 Auswahl eines DNA-Extraktionsverfahrens

Zur Ermittlung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens wurden, wie unter Punkt 3.2.2.1.1 beschrieben, drei Methoden miteinander verglichen. Die im Folgenden dargestellten Versuche wurden mit Primerpaar ITS1/ITS4 (Bedingungen s. Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 13) durchgeführt.

Die Auswahl erfolgte anhand von zwei ausgewählten Versuchen:

1. Amplifikation von Pilzreinkulturen (s. Punkt 3.2.3.2.1)
2. Bestimmung des Detektionslimits in Abhängigkeit des DNA-Extraktionsverfahrens (s. Punkt 3.2.3.2.2)

3.2.3.2.1 DNA-Amplifikation von Pilzreinkulturen in Abhängigkeit des DNA-Extraktionsverfahrens

38 Reinkulturen (Tabelle 4) wurden eingesetzt und die Qualität der DNA-Extraktion in Abhängigkeit des verwendeten Verfahrens durch Amplifikation mittels PCR (s. Punkte 3.2.2.1.2 und 3.2.2.1.3, Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 13) überprüft.

3.2.3.2.2 Detektionslimit der PCR-SSCP-Analysemethode in Abhängigkeit des DNA-Extraktionsverfahrens

Zur Bestimmung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens wurde das Detektionslimit der PCR-SSCP-Methode in Abhängigkeit der DNA-Isolierungsmethoden ermittelt. Aliquots von Matratzenstaubproben von Erwachsenen aus dem Raum München, Deutschland, wurden mit gamma-Strahlen behandelt (1,0 MGy) und anschließend mit einer Sporensuspension mit bekannter Keimzahl von *Cladosporium herbarum* (DSM 63422), *Eurotium amstelodami* (DSM 62629) und *Penicillium chrysogenum* (DSM 844) artifiziell kontaminiert („gespikt“). Die Ermittlung und Einstellung der Sporenkonzentration erfolgte gemäß Punkt 3.2.1.2. Konzentrationen von 1×10^6 bis 1×10^1 Sporen/50 mg Staub (= 20.000.000 – 200 CFU/g Staub) wurden in die Versuchsreihe eingesetzt. Das Detektionslimit wurde im Dreifach-Ansatz je DNA-Extraktionsverfahren bestimmt. Jeweils zwei Negativkontrollen (bestrahlter, „ungepikter“ Staub) wurden als DNA-freie Kontrolle mit analysiert. Zudem wurde die Positiv- (Reinkulturextrakt) und Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser) der PCR mitgeführt.

3.2.3.2.3 Bestimmung des geeigneten Extraktionsverfahrens

Zur Bestimmung des am besten geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens wurde ein Rangfolgetest durchgeführt, welcher die Ergebnisse aus 3.2.3.2.1 und 3.2.3.2.2 berücksichtigt. Die Teilversuche wurden folgendermaßen gewichtet: DNA-Amplifikation von 38 Pilz-Genera und -Spezies mittels PCR (40 %), Bestimmung des Detektionslimits der PCR-SSCP-Analysemethode (60 %; 20 %-Gewichtung je Einfachansatz; s. Punkt 3.2.3.2.2). Die Festsetzung der einzelnen Beobachtungswerte ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Beobachtungswerte des Rangfolgetests zur Bestimmung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens für Pilze aus Staubproben

DNA-Amplifikation von Reinkulturen (Anzahl) [40 %]	Detektionslimit PCR-SSCP-Methode [60 %; 20 % je Einfachansatz]
38 – 33	200 CFU/g Staub
32 – 27	2.000 CFU/g Staub
26 – 20	20.000 CFU/g Staub
19 – 14	200.000 CFU/g Staub
13 – 8	2.000.000 CFU/g Staub
8 – 0	20.000.000 CFU/g Staub

[Gewichtung] der einzelnen Versuche in Klammern.

Das auf diese Weise ermittelte DNA-Extraktionsverfahren (PowerSoil™ DNA Isolation Kit) wurde zusammen mit dem ausgewähltem Primerpaar (ITS1/ITS4; s. Punkt 3.2.3.1.5) für die folgenden Versuche verwendet.

3.2.3.3 Entwicklung eines PCR-SSCP-Pilz-Speziesstandards („Spec“)

Zur Vergleichbarkeit mehrerer Polyacrylamidgele untereinander, genauer zur Durchführung eines Normalisierungsschritts mittels der Software GelCompar[®] II, wurde ein Speziesstandard (sog. „Spec“) als Laufweitenkontrolle für die PCR-SSCP-Analyse entwickelt. Hierfür wurde die Separation von zehn DSMZ-Referenzstamm-Reinkulturen mit der eines Gemisches aller zehn Stämme im Polyacrylamidgel verglichen. Aufgrund dessen wurden schließlich acht Referenzstämme in den Speziesstandard aufgenommen (Anordnung von oben nach unten): *Penicillium chrysogenum* (DSM 844), *Aureobasidium pullulans* (DSM 2404), *Aspergillus versicolor* (DSM 1943), *Acremonium strictum* (DSM 3567T), *Eurotium amstelodami* (DSM 62629), *Cladosporium herbarum* (DSM 63422), *Alternaria alternata* (DSM 1102), *Wallemia sebi* (DSM 5329) (Abbildung 11).

3.2.3.4 Vorselektion des ITS1/ITS4-PCR Produkts mit einer Fragmentgröße von 570-590 bp nach Amplifikation von Staub-DNA-Extrakten

Nach Abschluss der Methodenentwicklung und -validierung (s. Punkte 3.2.3.1 bis 3.2.3.3) mittels 38 Reinkulturproben (s. Punkt 3.1.1) wurde festgestellt, dass bei der Amplifikation von Total-DNA-Extrakten aus ländlichen Staubproben, neben der beschriebenen (WHITE ET AL., 1990) und in der eigenen Studie bestätigten Fragmentgröße von 570-590 bp, zusätzlich Fragmente mit Größen von etwa 350 bp sowie 750 bp im Agarosegel detektiert wurden. Nach Sanger-Sequenzierung (s. Punkt 3.2.2.1.11) wurden diese als *Candida* sp. (ca. 350 bp) und pflanzliche DNA (ca. 750 bp) identifiziert (s.a. Anhang B4). Hierdurch könnten Größeneffekte in der PCR-SSCP-Analyse sowie bei der Parallelsequenzierung auftreten. Zudem sollte pflanzliche DNA so weit wie möglich aus den Untersuchungen der Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde die PCR-SSCP Basismethode (s. Punkt 3.2.2.1) für die Anwendung der Endmethode um drei Arbeitsschritte verlängert:

1. Nach Visualisierung des PCR-Produkts im Agarosegel erfolgte eine Vorselektion des 570-590 bp Fragments durch Ausschneiden mit einem DNA-freien Skalpell unter UV-Licht mit anschließender Reinigung der DNA aus dem Agarosegelstück (QIAquick GelExtraction Kit, QIAGEN; nach Herstellerangaben; Flussdiagramm s. Anhang B2).

2. Zur Erlangung einer ausreichenden DNA-Konzentration für die PCR-SSCP-Analyse (min. 400 ng) wurde die DNA-Probe erneut mit Primerpaar ITS1/ITS4 amplifiziert.
3. Zur Kontrolle wurde das erhaltene PCR-Produkt wieder per Agarose-Gel-elektrophorese visualisiert.

Die validierte Endmethode ist in Abbildung 6, Punkt 3.2.4, zusammengefasst.

3.2.3.5 Bestimmung der Reproduzierbarkeit der entwickelten PCR-SSCP-Methode

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der entwickelten PCR-SSCP-Methode wurde die Übereinstimmung von Bandenprofilen im Polyacrylamidgel verglichen. Als Probenmaterial wurden drei Stall- (Huhn, Kuh und Schwein) und eine Matratzenstaubprobe eingesetzt (s. Punkt 3.1.2).

Drei unabhängige Untersuchungen wurden durchgeführt: (1) Fünffacher Auftrag je einer Probe pro Staub auf dasselbe Polyacrylamidgel (Intragel-Variation; alle vier Staubproben), (2) Fünffacher Auftrag je einer Probe pro Staub auf fünf verschiedene Polyacrylamidgele (Intergel-Variation / Gel-zu-Gel-Vergleich; ohne Hühnerstallstaub) und (3) Extraktion jeder Staubprobe an fünf verschiedenen Tagen und Auftrag auf dasselbe Polyacrylamidgel (Intertag-Variation; nur Hühner- und Schweinestallstaub). Die Auswertung der Bandenprofile und die Bestimmung der Ähnlichkeiten erfolgte gemäß Punkt 3.2.2.1.10.

3.2.4 PCR-SSCP zur Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Staubproben (Darstellung der validierten Endmethode)

Zur Untersuchung von Stall- und Hausstaubproben („Feldproben“) und zur Bestimmung der Diversität der darin befindlichen Pilze wurde nach Abschluss der Entwicklung und Validierung der PCR-SSCP-Methodik folgender, zusammengefasster Versuchsablauf angewendet (Abbildung 6). Im Anschluss erfolgte die digitale Auswertung der Polyacrylamidgele und Weiterbetrachtung der Ergebnisse gemäß den Punkten 3.2.2.1.10 und 3.2.2.1.11.

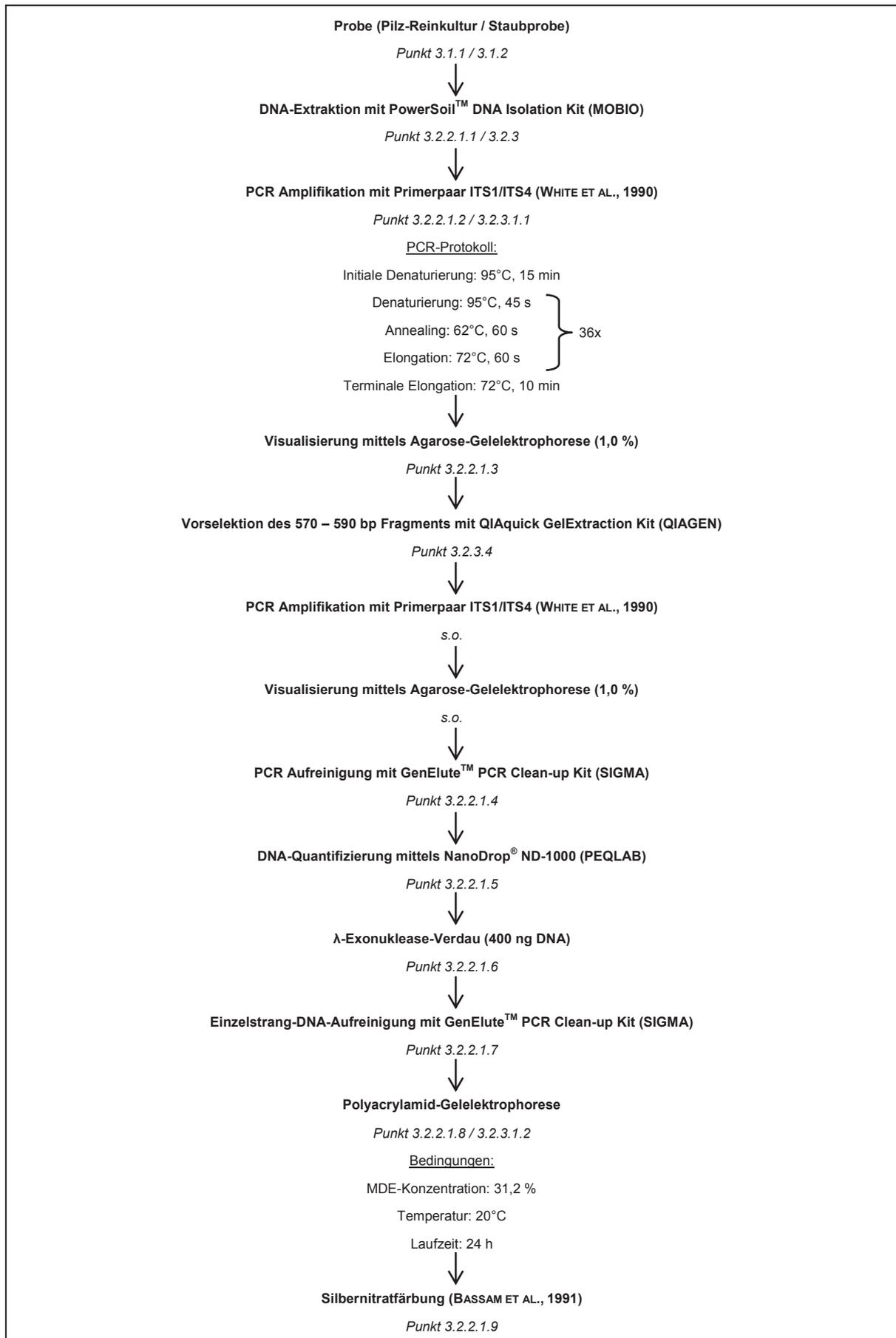


Abbildung 6: Arbeitsschritte der validierten PCR-SSCP-Methode

3.2.5 Untersuchung der Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die entwickelten Methoden für die Untersuchung von Stall- und Hausstaubproben in Bezug auf die Bestimmung der Pilzdiversitäten anwendbar sind. Als Probenmaterial wurden drei Stall- (je einmal aus Hühner-, Kuh- und Schweinestall) und drei Matratzenstaubproben (eine hiervon für die PCR-SSCP-Analyse und die kulturelle Untersuchung sowie alle drei für die Parallelsequenzierung) der TUM Versuchsstation Thalhausen, Deutschland, und des Gut Achselschwang des LfL Bayern, Deutschland, (s. Punkt 3.1.2) ausgewählt.

3.2.5.1 PCR-SSCP-Analyse

Die Probenaufbereitung und die Durchführung der PCR-SSCP-Analyse erfolgte wie in Abbildung 6 beschrieben. Zehn dominante Banden wurden im Anschluss ausgewählt und für die Sanger-Sequenzierung (s.a. Punkt 3.2.2.1.11) vorbereitet und ausgewertet: drei Banden stammten vom SSCP Profil der Kuh- und Schweinestallstaubprobe, zwei Banden von der Hühnerstall- und Matratzenstaubprobe.

3.2.5.2 Kulturelle Untersuchungen

Zur Plausibilitätsprüfung der durch die PCR-SSCP-Analyse mit angeschlossener Sanger-Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse wurden diese mit der kulturellen, mykologischen Untersuchung derselben Proben verglichen. Die Bestimmung erfolgte auf Genusebene. 100 mg Staub wurde hierfür in 9,9 mL NaCl (pH 7,4) suspendiert und 100 µL auf Sabouraud-2 % Glucose-Agar und DG18-Agar (s. Punkt 3.1.6) für sieben Tage bei RT kultiviert. Die Identifikation der Pilze erfolgte morphologisch und per Lichtmikroskopie.

3.2.5.3 Parallelsequenzierung

Die Durchführung der Probenanalyse mittels Parallelsequenzierung folgte der Basismethodenbeschreibung (s. Punkt 3.2.2.2). Eine Vergleichsanalyse zwischen dem nativen Total-DNA-Extrakt und den Proben mit vorselektiertem 570-590 bp Fragment (s.a. Punkt 3.2.3.4) wurde hinsichtlich Sequenzanzahl und Identifikation der häufigsten Pilze durchgeführt sowie die Ergebnisse mit denen der PCR-SSCP-Analyse und der kulturellen Untersuchungen verglichen.

3.2.6 Molekularepidemiologische Untersuchungen zur Assoziation zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko bei Schulkindern (GABRIEL)

Das verwendete Probenmaterial sowie dessen Handhabung für die molekularepidemiologischen Untersuchungen sind unter Punkt 3.1.2 beschrieben.

3.2.6.1 PCR-SSCP-Analyse von Matratzenstaubproben (GABRIEL)

Die Untersuchung von 844 Matratzenstaubproben von Kindern aus dem bäuerlichen Umfeld im Rahmen der GABRIEL-Studie folgte der PCR-SSCP-Methodenbeschreibung in Abbildung 6 (s. Punkt 3.2.4). Die Polyacrylamidgele wurden bis zur digitalen Auswertung in einer luftdichten Plastikfolie im Dunkeln bei RT geschützt gelagert.

3.2.6.2 Digitale Auswertung der GABRIEL-Polyacrylamidgele mit der Software GelCompar[®] II

Die 844 SSCP-Bandenprofile auf 54 Polyacrylamidgelen wurden mit Hilfe der Software GelCompar[®] II miteinander verglichen (s. Punkt 3.2.2.1.10) und je Profil 2019 arbiträre Dichtewerte als Text-Datei (.txt) exportiert. Die dabei ermittelten Bandenpositionen gaben die relative Laufweite im Polyacrylamidgel wieder.

Zusätzlich wurde die Bandmatching-Anwendung der Software eingesetzt, um automatisch Profilbanden in Bezug auf Nachbarbanden zu bestimmen. Hierbei wurden die Banden zu sogenannten Bandenklassen (%) zusammengefasst. Die Bandenklassen orientierten sich anhand der relativen Laufweite einer jeden Bande im Polyacrylamidgel, wobei 0 % den Startpunkt und 100 % den Endpunkt des Gels wiedergibt. 14 Varianten der Bandmatching-Analyse wurden hinsichtlich der Anzahl an identifizierten Banden je Profil, Fehlklassifikationen von Banden sowie der Ermöglichung einer nachfolgenden, biostatistischen Auswertung (möglichst wenig „0“-Werte) überprüft. Diese sind in Tabelle 16 dargestellt; zwei Varianten mit einer Positionstoleranz von 1,0 % sind nicht aufgelistet, da diese zu einer vermehrt unsicheren Bandenklassifikation führten.

Tabelle 16: Liste der überprüften Parameter-Einstellungen für die GelCompar® II Bandmatching-Anwendung

Var	<i>Bandmatching</i>					<i>Bandenklassenfilter</i>			
	Opt	posT	Änderung zu Profilende	minH	minS	Profiling pro Klasse i.D.	rel. Fläche pro Klasse	minP	minF
1	0.5%	0.5%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2	0.5%	0.5%	0%	0%	0%	5%	10%	5%	10%
3	0.5%	0.5%	0%	0%	0%	10%	10%	10%	10%
4	0.5%	0.5%	0%	0%	0%	20%	20%	20%	20%
5	1.0%	0.5%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
6	1.0%	0.5%	0%	0%	0%	5%	10%	5%	10%
7	1.0%	0.5%	0%	0%	0%	20%	20%	20%	20%
8	0.5%	0.5%	0%	2%	2%	5%	10%	5%	10%
9	0.5%	0.5%	0%	2%	2%	0%	0%	0%	0%
10	0.5%	0.5%	0%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
11	0.5%	0.5%	0%	1%	1%	5%	10%	5%	10%
12	0.5%	0.5%	0%	1%	1%	10%	15%	10%	15%

Var: Variante; Opt: Optimierung; posT: Positionstoleranz; minH: minimale Höhe/Größe; minS: minimale Fläche; i.D.: im Durchschnitt; rel.: relativ; minP: minimales Profiling; minF: minimale Fläche

3.2.6.3 Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse der GABRIEL-Proben

Die Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Markus Ege, Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius, mit der Software R 2.14.2 durchgeführt. Zwei unterschiedliche Annäherungen wurden angewendet: (1) die arbiträren Dichtewerte wurden als 2019 unabhängige Expositionsvariablen betrachtet und (2) Bandmatching wurde durch die Software GelCompar® II vollzogen und die detektierten Bandenklassen als unabhängige Expositionsvariablen verwendet. Alle Banden am Rand des Polyacrylamidgels (< 200 und > 1800 arbiträre Dichteeinheiten) wurden als Artefakte betrachtet und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für die qualitative Analyse wurden dichotomisierte Variablen mit Cut-off-Werten von 5 und 10 arbiträren Dichte-

einheiten erzeugt. Für die quantitative Analyse wurden Dichtewerte bzw. Bandenintensitäten nach Addition von 1 logarithmiert und damit annähernd in eine Normalverteilung überführt. Als Ergebnisvariable wurde Asthma als mindestens einmalige Diagnose von Asthma oder als mindestens zweimalige Diagnose einer asthmatischen Bronchitis definiert. Alle Variablen wurden für Aufwachsen auf einem Bauernhof adjustiert. Die Proben entstammten einer stratifizierten Stichprobe ($n = 844$) aus der GABRIEL-Studie und repräsentierten ca. 11.000 Individuen. Aufgrund des Studiendesigns wurden gewichtete, stratifizierte Regressionsmethoden verwendet. Die Assoziationen von Asthma mit den jeweiligen Bandenpositionen (Densitometrie) und Bandenklassen (Bandmatching) wurden als Kreuzproduktverhältnisse (engl. Odds ratios/OR) dargestellt. $OR < 1$ deuten auf eine negative Assoziation („Asthmaprotektion“), $OR > 1$ auf eine positive Assoziation („Asthmainduktion“) in Bezug auf Asthma/asthmatische Bronchitis hin; $OR = 1$ bedeutet keine Assoziation. $OR > 100$ und $< 0,1$ wurden als Artefakte betrachtet und deshalb ausgeschlossen.

3.2.6.4 Bandenauswahl und Sanger-Sequenzierung (GABRIEL)

Bei der densitometrischen Auswertung wurden Banden(positionen) für die weitere Analyse ausgewählt, sofern sie bei zwei der drei unterschiedlichen, statistischen Berechnungen (Cut-off 5 bzw. 10 arbiträre Dichteeinheiten, kontinuierliche Variable) erfasst wurden. Nah aneinander liegende Banden ($< 0,5$ % Positionstoleranz) wurden als eine Bande betrachtet.

Bei der Bandmatching-Auswertung wurden diejenigen Banden(klassen) ausgewählt, die eine Signifikanz bzgl. der positiven oder negativen Assoziation zu Asthma/asthmatischer Bronchitis von $< 0,1$ aufwiesen.

Die signifikanten Banden wurden gemäß Punkt 3.2.2.1.11 weiter untersucht. Dies wurde jeweils mindestens im Dreifachansatz durchgeführt, indem von mindestens drei unterschiedlichen Profilen Banden ausgewählt wurden. Waren die Ergebnisse übereinstimmend, wurden die Sequenzen als relevant betrachtet.

3.2.6.5 Weiterführende Untersuchungen nach Sanger-Sequenzierung (GABRIEL)

Für die Bandenpositionen der densitometrischen Auswertung 621 (signifikant bei Cut-off 5 arbiträre Einheiten und kontinuierliche Verwendung der Variablen) und 627 (signifikant bei Cut-off 5 und 10 arbiträren Einheiten) wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

3.2.6.5.1 Veränderung der PCR-SSCP Bedingungen

Zur Spezifikation der zusammenhängenden oder getrennten Betrachtung der nah aneinander liegenden Bandenpositionen wurden die PCR-SSCP-Bedingungen gegenüber dem Standardprotokoll (Abbildung 6) für die Ermöglichung einer besseren Auftrennung der Banden im Polyacrylamidgel folgendermaßen abgeändert: (1) Erhöhung der MDE-Konzentration auf 35,0 % und Verlängerung der Laufzeit auf 28 h; (2) wie (1) mit einer Laufzeit von 32 h; und (3) Erhöhung der MDE-Konzentration auf 40,0 % und Verwendung einer Laufzeit von 32 h.

Bei den aufgetragenen Proben handelte es sich um die, nach Punkt 3.2.2.1.11, aus dem Polyacrylamidgel mittels „Crush and Soak“ Protokoll extrahierten Einzelstrang-DNA-Sequenzen. Diese wurden mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 amplifiziert und für die PCR-SSCP-Analyse vorbereitet.

3.2.6.5.2 Speziesspezifische Untersuchungen

Um bei den per Sanger-Sequenzierung untersuchten Proben der Bandenpositionen 621 und 627 eine speziesspezifische Aussage zu ermöglichen, wurden vier speziesspezifische Primer – PchryF4-1/PchryR8 (*Penicillium chrysogenum*), PchryF1/PauraR1 (*Penicillium crustosum / commune / camembertii / echinolatum / solitum*), E1m/E2 (*Exophiala jeanselmei*), ExdF/ExdR (*Exophiala dermatitidis*) – aus der Literatur (s. Tabelle 17) ausgewählt und die „Crush and Soak“ Proben, die Proben mit dem vorselektierten 570-590 bp Fragment und das native DNA-Extrakt der jeweiligen Probennummer mittels PCR (s. Punkt 3.2.2.1.2) amplifiziert. Die Eigenschaften der Primer sind in Tabelle 17, die PCR-Protokolle in Tabelle 18 dargestellt. Als Positivkontrollen für die PCR-Amplifikation dienten Referenzstämme der DSMZ: *Penicillium chrysogenum* (DSM 844) und *Exophiala jeanselmei* (DSM 1876). Eine Referenzkultur von *Exophiala dermatitidis* konnte nicht erworben werden. Als Negativkontrolle wurde Nuklease-freies Wasser eingesetzt.

Tabelle 17: Ausgewählte speziesspezifische Primer für *Penicillium* spp. und *Exophiala* spp.

Primer	Sequenz	Zielregion	Produktgröße [bp]	Annealing-Temp. [°C]	Referenz
PchryF4-1	GCCTGTCCGAGCGTCACTT	ITS	70	57	EPA, USA, 2009
PchryR8	CCCCGGGATCGGAG				
PchryF1	CGGGCCCGCCTTAAC	ITS	121	57	EPA, USA, 2009
PauraR1	GAAAGTTTTAAATAATTTATA TTTTCACTCAGAGTT				
E1m	TGAGGTGCTACAGTTATTAC	Cytochrom b (mito.)	402	50	WANG ET AL., 2011
E2	GGTATAGMTCTTAAWATAGC				
ExdF	CCGCCTATTCAGGTCC	ITS	455	60	NAGANO ET AL., 2008
ExdR	TCTCTCCCACTCCCGC				

EPA: Environmental Protection Agency; mito.: mitochondrial

Tabelle 18: PCR Bedingungen für speziesspezifische Primer für *Penicillium* spp. und *Exophiala* spp.

Primer-paar	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Anzahl Zyklen	Terminale Elongation
PchryF4-1/ PchryR8		95°C, 45 s	57°C, 60 s	72°C, 60 s	40	
PchryF1/ PauraR1	95°C, 15 min	95°C, 45 s	57°C, 60 s	72°C, 60 s	40	72°C, 10 min
E1m / E2		95°C, 60 s	50°C, 60 s	72°C, 120 s	30	
ExdF/ExdR		95°C, 45 s	60°C, 60 s	72°C, 60 s	40	

3.2.6.6 Bandenauswahl und Parallelsequenzierung (GABRIEL)

Die aus den ausgeschnittenen Polyacrylamidgel-Banden zurückgewonnene DNA (s. Punkt 3.2.6.4) wurde zusätzlich mittels Parallelsequenzierung untersucht, um Einzelsequenzen für die weitere Auswertung hinsichtlich Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Sanger-Sequenzierung (s. Punkt 3.2.6.4) und der Bestimmung der Sequenzdiversität je Probenbande zu ermitteln. Hierfür wurde jede Probe mit einem unterschiedlichen Barcode markiert und die Proben nach Herstellerangaben und der

Basismethodenbeschreibung (s. Punkt 3.2.2.2) analysiert. Um eine noch stringenterer Entfernung von kleinen Fragmenten zu ermöglichen, wurde im Vorfeld der Probenaufreinigung mittels *Short Fragment Removal Procedure for the Amplicon Library Preparation Procedure* (TCB-2011-007, Januar 2012) das avisierte DNA-Fragment aus dem Agarosegel über Gelextraktion (s.a. Punkt 3.2.3.4) selektiert.

3.2.6.7 Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben (GABRIEL) - Pilotversuch

Neben der PCR-SSCP-Analyse (s. Punkt 3.2.6.1) sollten die Matratzenstaubproben der GABRIEL-Studie zusätzlich mit Hilfe der Parallelsequenzierung untersucht werden. Für den Pilotversuch wurden 60 Proben ausgewählt. Jeweils 15 Proben stammten aus einer der vier Hauptgruppen der epidemiologischen Untersuchung (Abbildung 5). Das ITS1/ITS4-570-590 bp-Fragment wurde mittels Gelextraktion aus dem Agarosegel (s.a. Punkt 3.2.3.4) selektiert. Die weitere Probenvorbereitung, die Durchführung der Sequenzierung und die Auswertung der erhaltenen Sequenzinformationen folgten Punkt 3.2.2.2. Die Pilzdiversität in Abhängigkeit der Probengruppe wurde anhand der Häufigkeit der einzelnen OTUs bestimmt.

Die statistische Analyse für die Bestimmung von Assoziationen zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko wurde mit der Software R 2.14.2 durchgeführt. Als Ergebnisvariable wurde diagnostiziertes Asthma oder asthmatische Bronchitis verwendet. Alle Variablen wurden hinsichtlich Bauernhofzugehörigkeit adjustiert. OTUs, die bei weniger als fünf Kindern auftraten, wurden ausgeschlossen. Die Diversität wurde als Summationswert dargestellt. Da das Probenmaterial eine stratifizierte Stichprobe aus der GABRIEL-Gesamtstudie war, wurden gewichtete, stratifizierte Regressionsmethoden eingesetzt und multiples Testen nicht durchgeführt. Die Ergebnisse wurden wie bei Punkt 3.2.6.3 in Form von Odds ratios dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Adaption der PCR-SSCP Basismethode an die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Stall- und Hausstaubproben

4.1.1 Gezielte Auswahl und Evaluierung eines geeigneten Primerpaares

4.1.1.1 Amplifikation von Pilzreinkulturen

Das Primerpaar der Wahl sollte die Detektion einer möglichst großen Anzahl unterschiedlicher Pilzarten ermöglichen. Aufgrund der Literaturlauswertung wurden daher sechs Primerpaare (Tabelle 11) ausgewählt, welche verschiedene Fragmente der ribosomalen DNA (rDNA) der Pilze amplifizierten. Dazu gehören die kleine Untereinheit 18S rDNA, die große Untereinheit 28S rDNA sowie die gesamte ITS Region (ITS 1 und 2) zwischen den beiden Untereinheiten inklusive der 5,8S rDNA. Die vergleichende Untersuchung dieser Primerpaare wurde mit DNA von 38 Pilzspezies (Reinkulturen), welche mit drei unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren isoliert wurde (s. Punkt 3.2.2.1.1), durchgeführt.

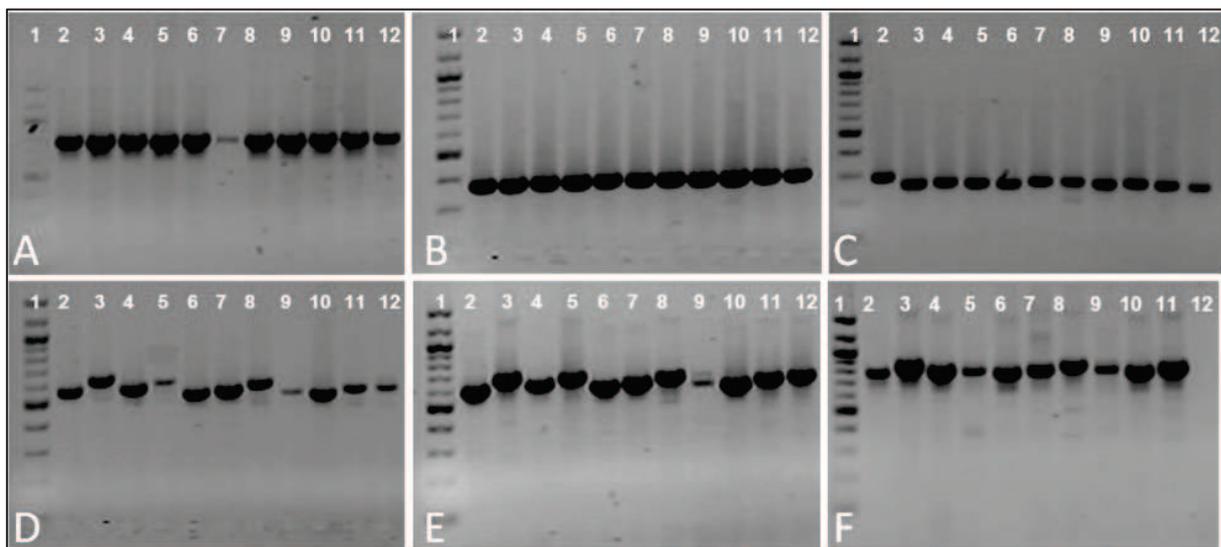


Abbildung 7: Darstellung von PCR-Amplifikaten unterschiedlicher Pilzarten; Vergleich von sechs universellen, Pilz-spezifischen Primerpaaren

Primerpaare: A: 0817/1536; B: NS7/NS8; C: U1/U2; D: ITS1/ITS4; E: ITS1F/ITS4; F: Fun18sf/ITS4

Auftragsreihenfolge: 1: 100 bp DNA ladder; 2: *Wallemia* sp.; 3: *Trichoderma* sp.; 4: *Aureobasidium pullulans*; 5: *Trichothecium roseum*; 6: *Cladosporium* sp.; 7: *Alternaria* sp.; 8: *Moniliella* sp.; 9: *Chrysonilia* sp.; 10: *Epicoccum* sp.; 11: *Chaetomium* sp.; 12: *Stachybotrys chartarum*

Während bei den 18S und 28S rDNA Primerpaaren die Fragmentgröße zwischen unterschiedlichen Pilzspezies ungefähr gleich war, variierte diese leicht bei den Primern für die ITS Region (Abbildung 7 und Anhang B4). In fast allen Fällen war eine Amplifikation der 38 eingesetzten Pilzspezies mit allen sechs Primerpaaren erfolgreich (Tabelle 19). Leichte Unterschiede konnten in Abhängigkeit der genutzten DNA-Extraktionsmethode festgestellt werden, da zum Teil der Nachweis von *Stachybotrys* sp. und *Mucor spinosus* misslang; im Gegensatz zu den CTAB und GenElute™ Verfahren konnte jedoch die PowerSoil™ Methode die Detektion der beiden Pilzspezies ermöglichen.

Tabelle 19: Übersicht über die DNA-Amplifikation von 38 Pilzspezies mit sechs universellen, Pilz-spezifischen Primerpaaren

Pilzspezies	CTAB						PowerSoil™						GenElute™					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<i>Acremonium strictum</i> DSM 3567	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alternaria</i> sp.	+	+	+	+	+	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alternaria alternata</i> DSM 1102	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus clavatus</i> .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus glaucus</i> Group	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	s	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus versicolor</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus versicolor</i> DSM 1943	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM 2404	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chaetomium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chrysonilia</i> sp.	+	+	+	+	s	+	+	+	+	s	s	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cladosporium herbarum</i> DSM 63422	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Epicoccum</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fortsetzung Tabelle 19: Übersicht über die Amplifikation von 38 Reinkultur-Pilzspezies mit sechs universellen, Pilz-spezifischen Primerpaaren

Pilzspezies	CTAB						PowerSoil™						GenElute™					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<i>Eurotium</i> sp.	s	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eurotium amstelodami</i> DSM 62629	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eurotium chevalerie</i> DSM 62630	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Eurotium rubrum</i> DSM 62631	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium culmorum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moniliella</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mucor spinosus</i>	-	+	-	-	-	+	+	+	G	G	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium chrysogenum</i> DSM 844	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium brevicompactum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizopus peca</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	G	G	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 70451	+	+	+	G	G	G	+	+	+	+	G	G	+	+	+	+	+	+
<i>Stachybotrys</i> sp. Stamm I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stachybotrys</i> sp. Stamm II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Stachybotrys chartarum</i> S1114	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Stachybotrys chartarum</i> S1495	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichothecium roseum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Wallemia</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Wallemia sebi</i> DSM 5329	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Amplifikation; -: keine Amplifikation; G: größeres Fragment; s: schwache Bande

1 – 6: Primerpaarindex, s. Tabelle 11.

4.1.1.2 Laufweite der Reinkultur-Einzelstrang-DNA im Polyacrylamidgel

Zur Bewertung der Auftrennung im Polyacrylamidgel in Abhängigkeit des Primerpaares wurden mit Hilfe der PCR-SSCP-Methode DNA-Einzelstränge von sieben ausgewählten Pilzspezies unterschiedlicher, phylogenetischer Gruppen hergestellt und im Polyacrylamidgel getrennt (s. Punkt 3.2.3.1.2). Dabei wurden deutliche Unterschiede in der Laufweite der Banden in Abhängigkeit des gewählten Primerpaares sowie dessen Amplifikationsbereichs festgestellt (Abbildung 8). Sowohl kurze Amplifikate – wie bei den Primerpaaren U1/U2 (260 bp) und NS7/NS8 (377 bp) – als auch lange Amplifikate – wie bei den Primerpaaren 0817/1536 (762 bp) und Fun18sf/ITS4 (770-800 bp) – zeigten sehr ähnliche Laufweiten der Banden über das Gel; trotz Variation der Analysebedingungen hinsichtlich MDE-Konzentration und Laufzeit. Der Laufweitenunterschied war bei den langen Amplifikaten zwar ausgeprägter als bei den kurzen, aber weniger deutlich als bei den Primerpaaren ITS1/ITS4 (570-590 bp) und ITS1F/ITS4 (600-630 bp), welche eine Bandenverteilung über die gesamte Gellänge ermöglichten (Abbildung 8). Damit erwies sich die höhere Sequenzvariabilität in der ITS-Region als zielführend hinsichtlich einer besseren Laufweitenverteilung der PCR-Amplifikate unterschiedlicher Pilzarten im Polyacrylamidgel im Vergleich zu den hochkonservierten Bereichen der 18S und 28S rRNA Gene.

4.1.1.3 Zusätzliche Banden im Polyacrylamidgel in Abhängigkeit des Primerpaares

Nach der PCR-SSCP-Analyse von sieben phylogenetisch unterschiedlichen Pilzspezies erschienen trotz der Verwendung von Reinkulturen zum Teil zahlreiche Banden je Laufspur im Polyacrylamidgel (Abbildung 8). Generell gab es eine dominante Bande und zusätzlich schwächere Banden, wobei das Verhältnis der Intensitäten zwischen starker und schwacher Banden konstant war. Die Häufigkeit an zusätzlichen Banden unterschied sich sowohl in Summe als auch für eine einzelne Pilzspezies im Vergleich der sechs Primerpaare. Für Primerpaar U1/U2 wurden insgesamt 19 zusätzliche Banden gezählt, für die drei ITS-Primerpaare jeweils 34 sowie für 0817/1536 46 und für NS7/NS8 84 Banden.

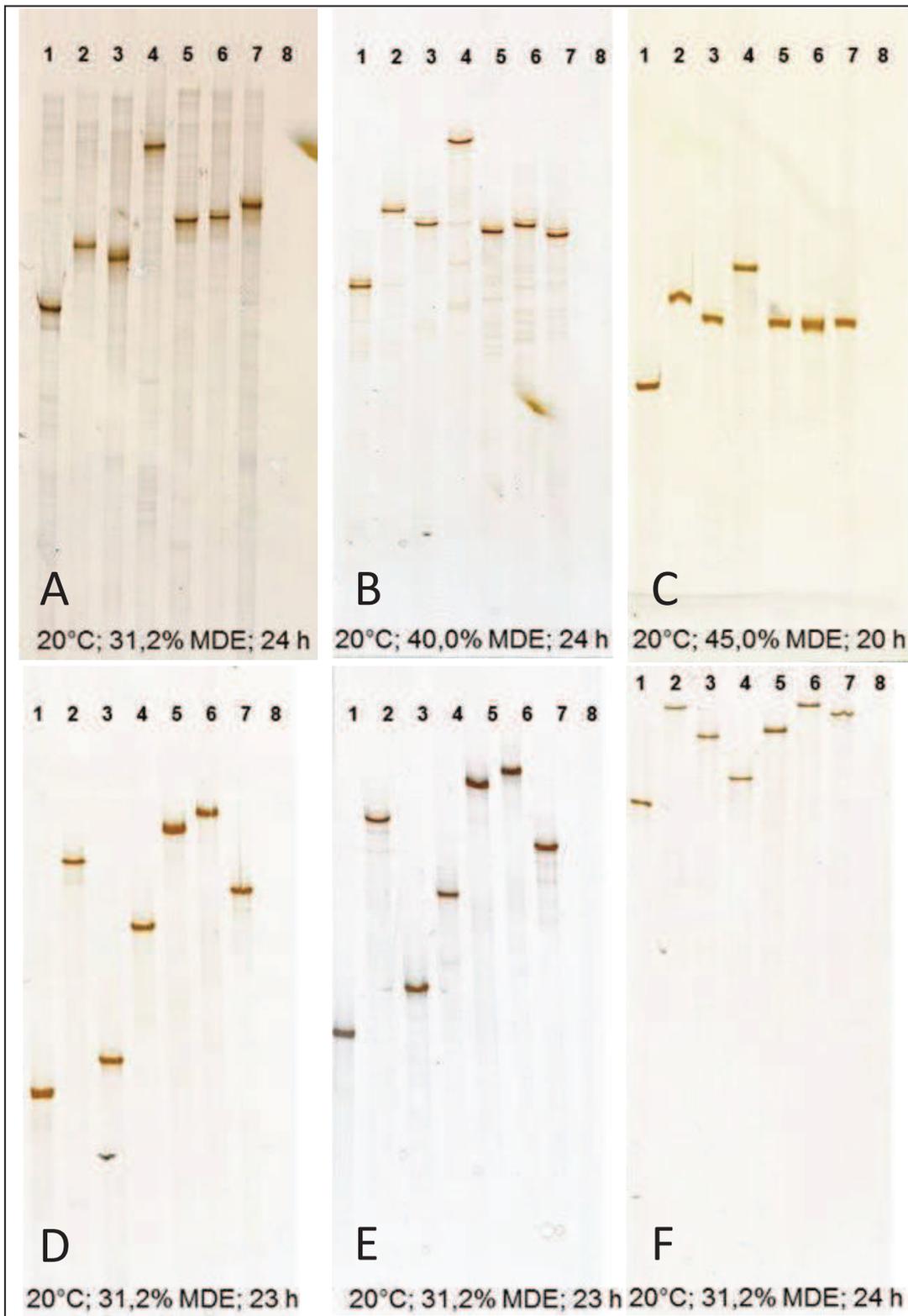


Abbildung 8: PCR-SSCP-Analyse von sieben Pilzarten: Trennung der „Einzelstränge“ im Polyacrylamidgel nach Anwendung von sechs universellen, Pilz-spezifischen Primerpaaren

Primerpaare: A: 0817/1536; B: NS7/NS8; C: U1/U2; D: ITS1/ITS4; E: ITS1F/ITS4; F: Fun18sf/ITS4.

Auftragsreihenfolge: 1: *Wallemia* sp.; 2: *Aureobasidium pullulans*; 3: *Cladosporium* sp.; 4: *Mucor spinosus*; 5: *Penicillium chrysogenum*; 6: *Aspergillus fumigatus*; 7: *Aspergillus glaucus*; Gruppe; 8: Negativkontrolle der PCR.

4.1.1.4 Bestimmung auf Speziesebene in Abhängigkeit des Primerpaares

Ein Ziel des Forschungsvorhabens war es, Pilze auf Speziesebene bestimmen zu können. Die Sanger-Sequenzierung von PCR-Produkten und nachfolgende Datenbankrecherchen ließen im Vergleich der sechs Primerpaare in allen Fällen eine Bestimmung auf Genusebene und in vielen Fällen auf Speziesebene zu. Zudem zeigte sich, dass die CBS-KNAW-Datenbank zum Teil eine genauere Bestimmung auf Speziesebene ermöglichte. Wie auch bei der qualitativen Beurteilung der DNA-Amplifikation von Pilzreinkulturen (s. Punkt 4.1.1.1) zeigte sich auch hier ein Vorteil bei der Verwendung der ITS-Primerpaare. So ermöglichten diese häufiger eine Identifizierung auf Speziesebene als die 18S und 28S rDNA Primer. Tabelle 21 fasst die Sequenzierergebnisse zusammen.

4.1.1.5 Evaluierung der angewandten Primerpaare

Für die Auswahl eines geeigneten Primerpaares wurden vier vergleichende Untersuchungen durchgeführt (s. Punkt 3.2.3.1). Gemäß der Bedeutung für das Forschungsvorhaben wurden die Ergebnisse der Einzeluntersuchungen unterschiedlich gewichtet (Tabelle 20). Die Beurteilung der Primerpaare erfolgte anhand einer Durchschnittsbenotung dieser Einzelergebnisse und einer Auswertung der Rangfolgen je Einzeluntersuchung im Vergleich der sechs Primerpaare. Die Berechnungen sind in Tabelle 20 dargestellt. Bei beiden Auswerteverfahren wurde die identische Gesamtreihenfolge ermittelt. Primerpaar ITS1/ITS4 war das Primerpaar sowohl mit der besten Durchschnittsnote als auch mit dem besten (Gesamt-) Rang und wurde als Primerpaar der Wahl für die kommenden Versuche betrachtet.

Tabelle 20: Ergebnisse der Evaluierung der angewandten Primerpaare

Noten pro Untersuchung					
Primer-paar	Identifikation auf Speziesebene [50 %]	Zusätzliche Banden im Polyacrylamidgel [20 %]	Auftrennung im Polyacrylamidgel [20 %]	Amplifikation von Reinkulturen [10 %]	Durchschnitts-note
1	4.0 (2 von 5)	3.0 (46)	2.0 (gut)	1.0 (108 von 114)	3.10
2	5.0 (1 von 5)	4.0 (84)	2.0 (gut)	1.0 (112 von 114)	3.80
3	4.0 (2 von 5)	1.0 (19)	3.0 (ungenügend)	1.0 (111 von 114)	2.90
4	2.0 (4 von 5)	2.0 (34)	1.0 (sehr gut)	1.0 (111 von 114)	1.70
5	3.0 (3 von 5)	2.0 (34)	1.0 (sehr gut)	1.0 (110 von 114)	2.20
6	3.0 (3 von 5)	2.0 (34)	3.0 (ungenügend)	1.0 (111 von 114)	2.60

Rang pro Untersuchung					
Primer-paar	Identifikation auf Speziesebene [50 %]	Zusätzliche Banden im Polyacrylamidgel [20 %]	Auftrennung im Polyacrylamidgel [20 %]	Amplifikation von Reinkulturen [10 %]	Gesamt-rang
1	4 (2 von 5)	5 (46)	3 (gut)	6 (108 von 114)	5 (42)
2	6 (1 von 5)	6 (84)	3 (gut)	1 (112 von 114)	6 (49)
3	4 (2 von 5)	1 (19)	5 (ungenügend)	2 (111 von 114)	4 (34)
4	1 (4 von 5)	2 (34)	1 (sehr gut)	2 (111 von 114)	1 (13)
5	2 (3 von 5)	2 (34)	1 (sehr gut)	5 (110 von 114)	2 (21)
6	2 (3 von 5)	2 (34)	5 (ungenügend)	2 (111 von 114)	3 (26)

[Gewichtung] und die (Untersuchungsergebnisse) sind in Klammern aufgeführt. Für den Primerpaar-index siehe Tabelle 11.

Tabelle 21: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von DNA-Amplifikaten von fünf Pilzarten nach Auswahl von sechs Primerpaaren

Primerpaar	1			2			3
	NCBI-BLAST	CBS-KNAW	NCBI-BLAST	CBS-KNAW	NCBI-BLAST	CBS-KNAW	CBS-KNAW
<i>Penicillium chrysogenum</i> (DSM 844)	<i>P. chrysogenum</i> (99 %) (JF718786.1)	<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (ATCC 10002)	<i>P. solitum</i> / <i>chrysogenum</i> / <i>camembertii</i> (100 %) (JN642222.1 / HQ882177.1 / GQ458039.1)	<i>P. camembertii</i> / <i>chrysogenum</i> / <i>commune</i> (100 %) (ATCC 10387 / ZJ-T2 / MA09-AL)	<i>Penicillium</i> sp. / <i>naliovense</i> / <i>chrysogenum</i> (100 %) (JQ778844.1 / JQ434685.1 / JQ434684.1)		<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (CBS 195.46)
<i>Aspergillus versicolor</i> (DMS 1943)	<i>A. versicolor</i> (99 %) (JN546128.1)	<i>A. versicolor</i> (100 %) (HDJZ-ZWM-16)	<i>A. versicolor</i> (99 %) (AB002064.1)	<i>A. versicolor</i> (99 %) (CBS 583.65)	<i>A. versicolor</i> (100 %) (JN938942.1)		<i>A. versicolor</i> (100 %) (DAOM 222010)
<i>Wallemia sebi</i> (DSM 5329)	<i>W. sebi</i> / <i>muriae</i> (99 %) (AF548108.1 / AY741381.1)	<i>W. sebi</i> / <i>muriae</i> (100 %) (ALI 158 / MZKI B-952)	<i>W. muriae</i> (100 %) (AY741381.1)	<i>W. muriae</i> (100 %) (CBS 116628)	<i>W. muriae</i> (99 %) (DQ847517.1)		<i>W. muriae</i> (99 %) (CBS 116628)
<i>Cladosporium herbarum</i> (DSM 63422)	<i>Cladosporium</i> sp. (99 %) (JX273057.1)	<i>Cladosporium</i> sp. (100 %) (ATCAJ-13 JERPCR563)	<i>Cl. bruhnei</i> / <i>uredinicola</i> / <i>cladosporioides</i> (100 %) (AY251093.2 / AY251096.2 / AY251097.2)	<i>Cl. cladosporioides</i> / <i>bruhnei</i> / <i>uredinicola</i> (100 %) (CPC 5101 / CPC 5390 / STE-U 3682)	<i>Cl. langeronii</i> (100 %) (DQ780380.2)		<i>Cl. langeronii</i> (100 %) (CBS 101880)
<i>Eurotium amstelodami</i> (DSM 62629)	<i>Eu. herbarorium</i> (99 %) (EU263606.1)	<i>Eu. herbarorium</i> (100 %) (NRRL 116)	<i>Eu. rubrum</i> (100 %) (U00970.1)	<i>Eu. rubrum</i> (100 %) (keine Nummer)	<i>Eu. chevalieri</i> / <i>amstelodami</i> (100 %) (JN938915.1 / JN938912.1)		<i>Eu. chevalieri</i> / <i>amstelodami</i> (100 %) (DAOM 216346 / DAOM 222011)
Identifikation auf Speziesebene	2 von 5	2 von 5	1 von 5	1 von 5	2 von 5		

Vergleich der NCBI-BLAST und CBS-KNAW Datenbank. Für Primerpaarindex siehe Tabelle 11. Datenbankübereinstimmungen, GenBank Nummern (NCBI-BLAST) und Stammnummern (CBS-KNAW) in Klammern. Korrekte Speziesidentifizierungen sind fett gedruckt.

Fortsetzung Tabelle 21: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von fünf Pilzarten nach Auswahl von sechs Primerpaaren

Primerpaar		4			5			6		
Referenzstamm	NCBI-BLAST	CBS-KNAW	NCBI-BLAST	CBS-KNAW	NCBI-BLAST	CBS-KNAW	NCBI-BLAST	CBS-KNAW		
<i>Penicillium chrysogenum</i> (DSM 844)	<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (JQ015265.1)	<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (SL302)	<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (JQ015265.1)	<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (CBS 112383)	<i>P. dipodomyicola / glandicola / griseovulvum</i> (99 %) (DQ339570.1 / DQ339565.1 / DQ339557.1)	<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (CBS 112383)	<i>P. chrysogenum</i> (100 %) (DTO 110-D3)			
<i>Aspergillus versicolor</i> (DMS 1943)	<i>A. versicolor</i> (99 %) (JF817276.1)	<i>A. versicolor</i> (100 %) (DTO 090-C2)	<i>Aspergillus sp. / versicolor</i> (99 %) (FJ755829.1 / FJ878627.1)	<i>A. versicolor</i> (100 %) (DTO 117-G9)	<i>A. versicolor</i> (99 %) (GQ229082.1)	<i>A. versicolor</i> (100 %) (DTO 117-G9)	<i>A. versicolor</i> (99 %) (DTO 055-G5)			
<i>Wallemia sebi</i> (DSM 5329)	uncultured / <i>Wallemia</i> sp. (98 / 96 %) (FJ820491.1 / FJ770080.1)	uncultured / <i>Wallemia sebi</i> (98 %) (BF-OTU501 / CBS 199.33)	uncultured / <i>Wallemia</i> sp. (98 / 97 %) (FJ820491.1 / GU931736.1)	uncultured / <i>W. muriae</i> (98 %) (BF-OTU501 / DTO 089-G5)	uncultured / <i>Wallemia</i> sp. (98 / 97 %) (FJ820491.1 / GU931736.1)	uncultured / <i>W. muriae</i> (98 %) (DTO 107-F4)				
<i>Cladosporium herbarum</i> (DSM 63422)	<i>Cl. cladosporioides</i> (100 %) (JN565298.1)	<i>Cl. cladosporioides</i> (100 %) (CBS 170.54)	<i>Cl. cladosporioides</i> (100 %) (AJ300335.1)	<i>Cl. cladosporioides</i> (100 %) (CBS 169.54)	<i>Cladosporium sp. / cladosporioides</i> (100 / 99 %) (EU167592.1 / GQ458030.1)	<i>Mycosphaerella asteroma</i> (100 %) (CBS 266.53)				
<i>Eurotium amstelodami</i> (DSM 62629)	<i>Eu. amstelodami</i> (100 %) (HQ728257.1)	<i>Eu. rubrum / chevalieri / amstelodami</i> (100 %) (UPM A6 / UPM A15 / NRRL 90)	uncultured / <i>Eu. amstelodami</i> (100 / 99 %) (GU721577.1 / HQ728257.1)	uncultured / <i>Eu. amstelodami</i> (100 %) (clone f2Fc36 / DTO 101-H1)	<i>Eurotium</i> sp. (99 %) (AM901691.1)	<i>Eu. amstelodami</i> (100 %) (DTO 071-B6)				
Identifikation auf Speziesebene	4 von 5			3 von 5			3 von 5			

Vergleich der NCBI-BLAST und CBS-KNAW Datenbank. Für Primerpaarindex siehe Tabelle 11. Datenbankübereinstimmungen, GenBank Nummern (NCBI-BLAST) und Stammmummern (CBS-KNAW) in Klammern. Korrekte Speziesidentifizierungen sind fett gedruckt.

4.1.2 Auswahl eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens

4.1.2.1 Amplifikation von Pilz-Reinkulturen

Von 38 Pilzspezies (Tabelle 4) wurden jeweils mit drei DNA-Extraktionsmethoden – PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO), GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA) und CTAB-Methode – die DNA isoliert und mit Primerpaar ITS1/ITS4 vervielfältigt. Es zeigten sich nur marginale Unterschiede zwischen den Verfahren (Tabelle 19; Primerpaar 4 (ITS1/ITS4)): Bei der DNA-Extraktion mit PowerSoil™ konnten alle 38 Pilzspezies amplifiziert werden; bei der GenElute™-Methode waren 37 von 38 amplifizierbar (ohne *Stachybotrys chartarum* S1114) und bei der CTAB-Methode 36 von 38 (ohne *Stachybotrys chartarum* S1495 und *Mucor spinosus*).

4.1.2.2 Bestimmung des Detektionslimits der PCR-SSCP-Methode in Abhängigkeit des DNA-Extraktionsverfahrens

Die Bestimmung des Detektionslimits in Abhängigkeit des DNA-Extraktionsverfahrens wurde im Dreifachansatz mit bestrahltem Matratzenstaub, welcher artifiziell mit einem Gemisch aus DSMZ-Referenzstämmen von *Cladosporium herbarum*, *Eurotium amstelodami* und *Penicillium chrysogenum* (Tabelle 4) kontaminiert wurde, durchgeführt (s. Punkt 3.2.3.2.2). Die eingesetzten Negativkontrollen (bestrahlter, nicht artifiziell kontaminierter Matratzenstaub) waren jeweils frei von DNA der eingesetzten DSMZ-Referenzstämme (Abbildung 9). Mit Hilfe des PowerSoil™ DNA Isolation Kits (MOBIO) konnte *Eu. amstelodami* in allen drei Fällen bis zu einer Konzentration von 200 CFU/g Staub nachgewiesen werden (Abbildung 9). Im Vergleich hierzu variierten die Sensitivitäten bei der CTAB-Methode zwischen 200 (1x) und 20.000 (2x) CFU/g Staub und beim GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA) zwischen 2.000 (2x) und 20.000 (1x) CFU/g Staub. Die anderen beiden eingesetzten Pilzspezies wiesen im Durchschnitt höhere Nachweisgrenzen auf (Abbildung 9). Dennoch war auch hier generell die Sensitivität mit dem PowerSoil™ Kit am höchsten. So variierte das Detektionslimit für *Cl. herbarum* beim Dreifachansatz zwischen 200 und 20.000 CFU/g Staub beim PowerSoil™ Kit, zwischen 200 und 200.000 CFU/g Staub bei der CTAB-Methode sowie zwischen 20.000 und 200.000 CFU/g Staub beim GenElute™ Kit. Die höchste Nachweisgrenze bei allen drei Extraktionsmethoden in diesem Versuchsansatz zeigte *P. chrysogenum*. Zum Teil – je einmal beim PowerSoil™ Kit und bei der CTAB Methode – konnte zwar auch

hier ein Detektionslimit von 200 CFU/g Staub ermittelt werden, allerdings war in vielen Fällen nur ein Nachweis bis 200.000 CFU/g Staub möglich (Abbildung 9).

4.1.2.3 Bewertung der angewandten DNA-Extraktionsverfahren

Zwei vergleichende Untersuchungen wurden für die Auswahl eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens durchgeführt und mittels Rangfolgetest gemäß deren Bedeutung für das Forschungsvorhaben ausgewertet (s. Punkt 3.2.3.2). Das Ergebnis des Rangfolgetests ist in Tabelle 22 dargestellt. Alle Versuche wurden mit dem unter Punkt 4.1.1.5 evaluierten Primerpaar ITS1/ITS4 vollzogen. Der PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) erwies sich als dasjenige DNA-Extraktionsverfahren mit den besten Ergebnissen.

Aus diesem Grund wurde die Kombination aus PowerSoil™ DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation mit Primerpaar ITS1/ITS4 für die weiteren Versuche angewendet.

Tabelle 22: Ergebnis des Rangfolgetests zur Bestimmung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens

DNA-Extraktionsverfahren	DNA-Amplifikation von Reinkulturen [40 %]	Detektionslimit der PCR-SSCP-Methode [20 % je Einfachansatz = 60 %]	Gesamtrang
PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO)	1 (38 von 38)	a: 1 (200 CFU/g) b: 1 (200 CFU/g) c: 1 (200 CFU/g)	1 (10)
GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA)	2 (37 von 38)	a: 1 (200 CFU/g) b: 2 (20.000 CFU/g) c: 3 (20.000 CFU/g)	2 (20)
CTAB-Methode	3 (36 von 38)	a: 3 (20.000 CFU/g) b: 2 (20.000 CFU/g) c: 2 (2.000 CFU/g)	3 (26)

[Gewichtung] und (Untersuchungsergebnisse) sind in Klammern aufgeführt. Detektionslimit bezogen auf die Nachweishöhe von *Eurotium amstelodami* (DSM 62629; Abbildung 9); a, b, c: Dreifachansatz der Bestimmung des Detektionslimits.

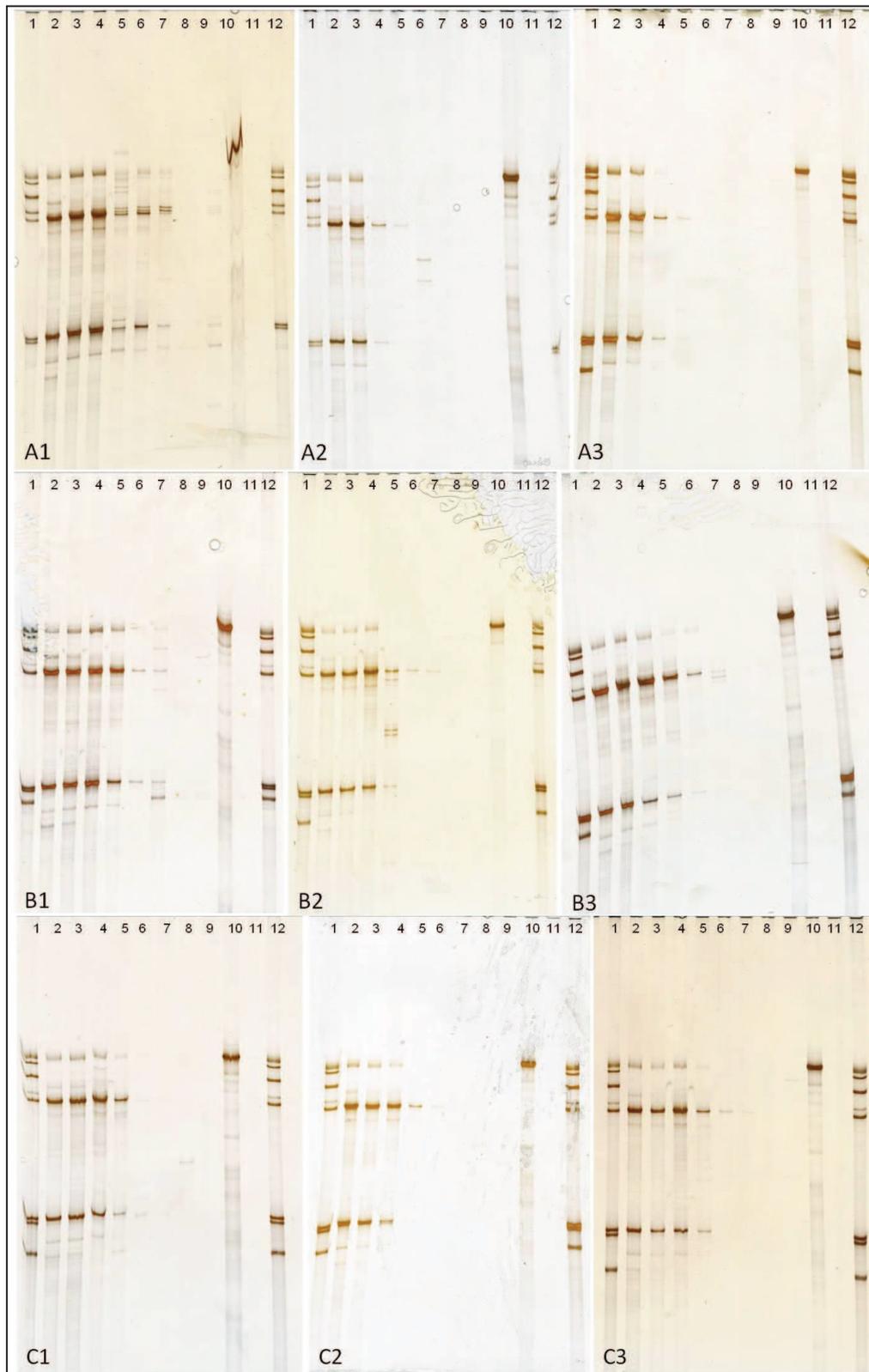


Abbildung 9: Bestimmung des Detektionslimits der PCR-SSCP Methode

DNA-Extraktionsverfahren: A1-A3: CTAB-Methode; B1-B3: PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO); C1-C3: GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA)

Auftragsreihenfolge: 1: Speziessstandard (s. Abbildung 11); 2: $2,0 \times 10^7$ CFU/g; 3: $2,0 \times 10^6$ CFU/g; 4: $2,0 \times 10^5$ CFU/g; 5: $2,0 \times 10^4$ CFU/g; 6: $2,0 \times 10^3$ CFU/g; 7: $2,0 \times 10^2$ CFU/g; 8: „DNA-freie“ Kontrolle; 9: „DNA-freie“ Kontrolle; 10: Positivkontrolle der PCR (Reinkultur von *P. chrysogenum*, DSM 844); 11: Negativkontrolle der PCR; 12: Speziessstandard (s. Abbildung 11).

4.1.3 Entwicklung eines PCR-SSCP-Pilz-Speziesstandards („Spec“)

Der Speziesstandard in der PCR-SSCP-Analyse diene der Laufweitenkontrolle, d.h. zur Kontrolle der Separationsbedingungen, und der nachfolgenden Gewährleistung der Vergleichbarkeit verschiedener Polyacrylamidgele durch Normalisierung mittels der Software GelCompar[®] II. Zehn Reinkulturen von DSMZ-Referenzstämmen wurden hierfür ausgewählt und einzeln oder als Gemisch eingesetzt: *Penicillium chrysogenum* (DSM 844), *Aureobasidium pullulans* (DSM 2404), *Aspergillus versicolor* (DSM 1943), *Acremonium strictum* (DSM 3567T), *Eurotium amstelodami* (DSM 62629), *Eu. chevalieri* (DSM 62630), *Eu. rubrum* (DSM 62631), *Cladosporium herbarum* (DSM 63422), *Alternaria alternata* (DSM 1102), *Wallemia sebi* (DSM 5329). Die Probenvorbereitung erfolgte, wie unter den Punkten 4.1.1 und 4.1.2 ermittelt, mit der Kombination aus PowerSoil[™] DNA Isolation Kit und dem Primerpaar ITS1/ITS4. Acht von zehn Stämmen trennten sich im Polyacrylamidgel gut voneinander (Abbildung 10) und konnten zu Banden des Gemisches zugeordnet werden. Einzig die drei verschiedenen *Eurotium* spp. zeigten exakt dieselbe Laufweite im Gel.

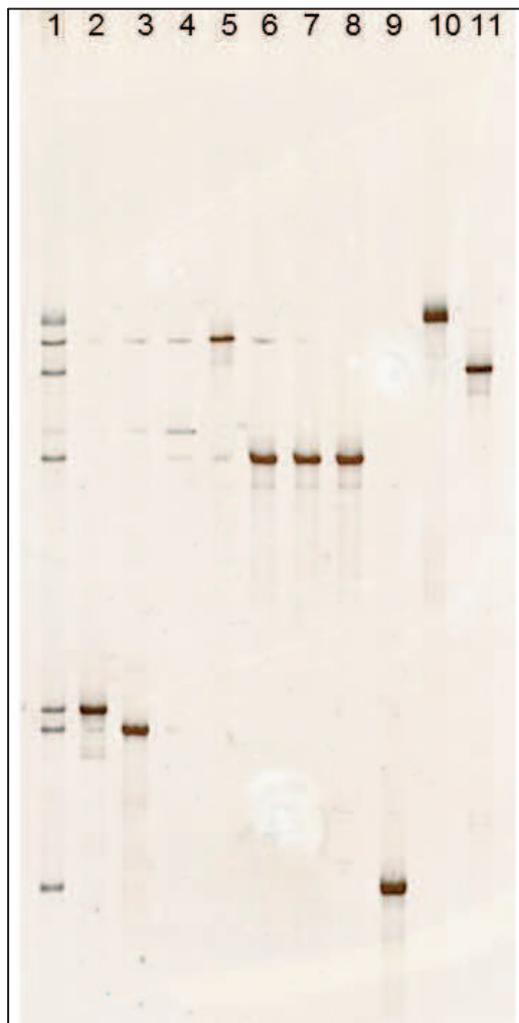


Abbildung 10: PCR-SSCP-Analyse von zehn DSMZ-Referenzstämmen

Auftragsreihenfolge: 1: Gemisch aller zehn DSMZ-Referenzstämmen; 2: *Cladosporium herbarum* (DSM 63422); 3: *Alternaria alternata* (DSM 1102); 4: *Acremonium strictum* (DSM 3567); 5: *Aureobasidium pullulans* (DSM 2404); 6: *Eurotium amstelodami* (DSM 62629); 7: *Eu. chevalieri* (DSM 62630); 8: *Eu. rubrum* (DSM 62631); 9: *Wallemia sebi* (DSM 5329); 10: *Penicillium chrysogenum* (DSM 844); 11: *Aspergillus versicolor* (DSM 1943)



Aus diesem Grund wurde nur ein Stamm (*Eu. amstelodami*) hiervon in den Speziesstandard übernommen, sodass dieser schließlich aus acht Referenzstämmen bestand (Abbildung 11).

Abbildung 11: Pilzspeziesstandard („Spec“) für die PCR-SSCP-Analyse (Normalisierung)

Anordnung: 1: *Penicillium chrysogenum* (DSM 844); 2: *Aureobasidium pullulans* (DSM 2404); 3: *Aspergillus versicolor* (DSM 1943); 4: *Acremonium strictum* (DSM 3567); 5: *Eurotium amstelodami* (DSM 62629); 6: *Cladosporium herbarum* (DSM 63422); 7: *Alternaria alternata* (DSM 1102); 8: *Wallemia sebi* (DSM 5329)

4.1.4 Reproduzierbarkeit der entwickelten PCR-SSCP-Methode

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der PCR-SSCP-Methode als wichtigen Faktor, u.a. für epidemiologische Untersuchungen, wurden Profil-zu-Profil-Vergleiche innerhalb eines Gels (Intragel-Variation), Gel-zu-Gel-Vergleiche (Intergel-Variation) und Vergleiche hinsichtlich Übereinstimmungen im Bandenprofil bei an unterschiedlichen Tagen extrahierten Proben (Intertag-Variation) durchgeführt. Abbildung 12 zeigt exemplarisch Polyacrylamidgele, die u.a. für die Bestimmung der Ähnlichkeiten der Bandenprofile bei der Hühnerstall-, Schweinestall-, Kuhstall- und Matratzenstaubprobe herangezogen wurden. Weitere Polyacrylamidgele für die Untersuchungen sind äquivalent hierzu anzusehen und sind nicht weiter dargestellt.

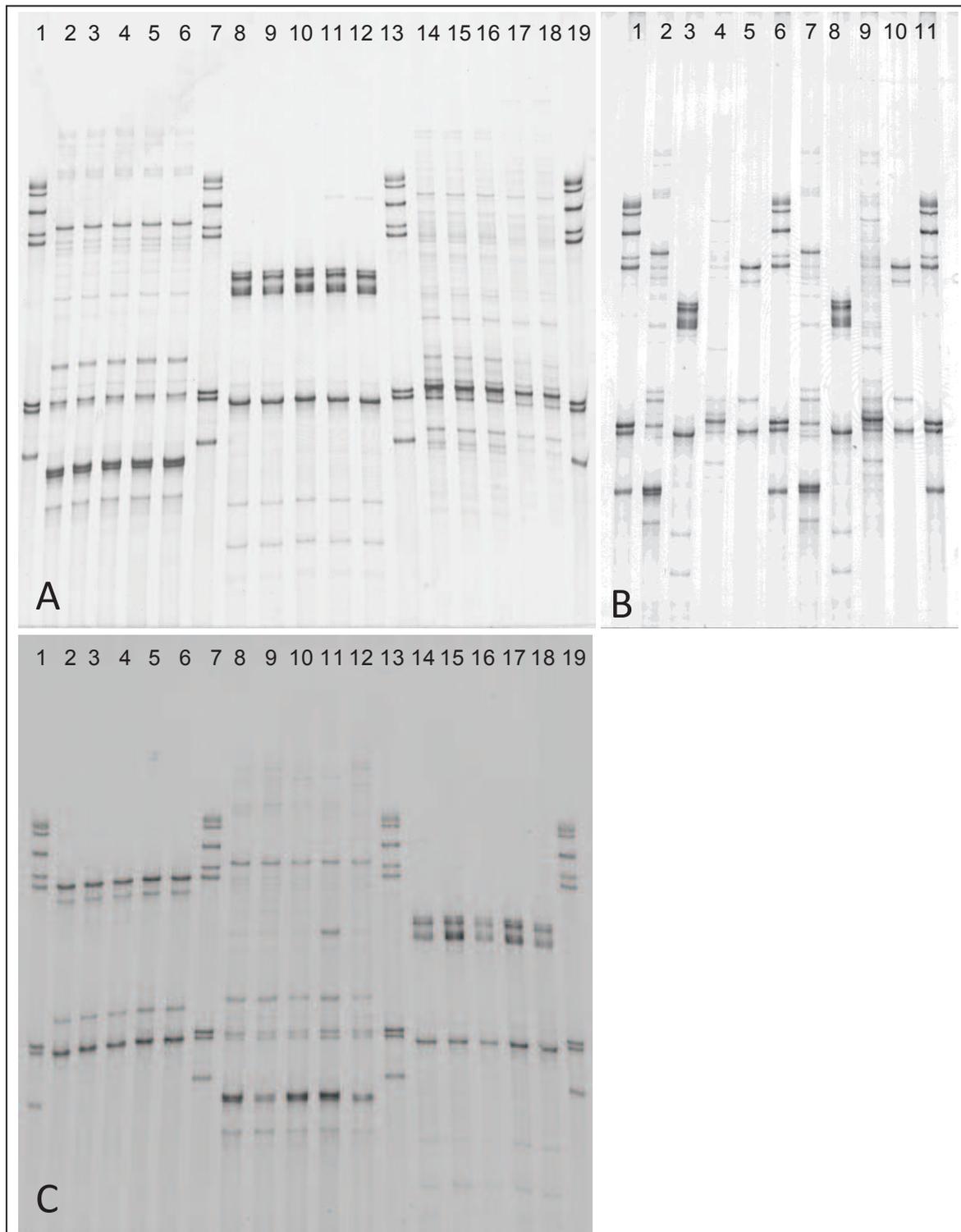


Abbildung 12: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der PCR-SSCP-Analysemethode

A: Polyacrylamidgel zur Bestimmung der Intragel-Variation für Hühnerstall- (links; 2-6), Schweinestall- (Mitte; 8-12) und Matratzenstaub (rechts; 14-18); 1/7/13/19: Speziesstandard.

B: Exemplarisches Polyacrylamidgel zur Bestimmung der Intergel-Variation. 1/6/11: Speziesstandard; 2/7: Hühnerstallstaub; 3/8: Schweinestallstaub; 4/9: Matratzenstaub; 5/10: Kuhstallstaub.

C: Polyacrylamidgel zur Bestimmung der Intragel-Variation für Kuhstallstaub (link; 2-6) und der Intertag-Variation für Hühnerstall- (Mitte; 8-12) und Schweinestallstaub (rechts; 14-18); 1/7/13/19: Speziesstandard

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, wiesen die erzeugten SSCP-Bandenprofile bereits augenscheinlich eine hohe Übereinstimmung bei allen drei Analyseparametern auf. Zur Bestimmung der exakten Übereinstimmungswerte wurde der Pearson Korrelationskoeffizient in Clusteranalysen der jeweiligen Staubprobe hinsichtlich Intragel-, Intergel- und Intertag-Variation mittels der Software GelCompar® II bestimmt. Im Mittel aller Proben lagen die Ähnlichkeitswerte der einzelnen Profile für den Vergleich innerhalb eines Polyacrylamidgels bei 94,94 % [SD = 2,51], für den Gel-zu-Gel-Vergleich bei 87,66 % [SD = 6,62] und für den Faktor „Vergleich unterschiedlicher DNA-Extraktionstage“ bei 93,03 % [SD = 4,69] (Tabelle 23). Im Vergleich der einzelnen Proben unterschiedlicher Herkunft variierten die Ähnlichkeitswerte deutlich. Je komplexer die Einzelprobe, desto geringer war die Ähnlichkeit und desto höher die Standardabweichungen im Vergleich zu Proben mit geringerer Bandenzahl (vgl. z.B. Intragel-Variation; Matratzenstaubprobe gegenüber den Stallstaubproben). Zudem zeigte sich, dass die Ähnlichkeiten der Bandenprofile beim Vergleich über mehrere Gele deutlich abnahmen. Tabelle 23 fasst die einzelnen Übereinstimmungswerte der Untersuchungen zusammen.

Tabelle 23: Reproduzierbarkeitswerte (Ähnlichkeiten der SSCP-Bandenprofile) von Staubproben unterschiedlicher Herkunft (Pearson Korrelations-Koeffizient (%)).

Anzahl der Analysen pro Staubprobe = 4 bzw. 5.

Staubquelle	Durchschnittlicher Pearson Korrelations-Koeffizient [%]		
	Intragel-Vergleich (n = 5)	Intergel-Vergleich (n = 4)	Intertag-Vergleich (n = 5)
Hühnerstall	98,23 [SD = 0,78]	n.d.	91,52 [SD = 4,42]
Schweinestall	97,77 [SD = 1,32]	88,13 [SD = 7,24]	94,53 [SD = 4,95]
Kuhstall	97,66 [SD = 1,09]	93,51 [SD = 3,98]	n.d.
Matratze	86,11 [SD = 6,86]	81,34 [SD = 8,64]	n.d.
Mittelwert	94,94 [SD = 2,51]	87,66 [SD = 6,62]	93,03 [SD = 4,69]

Einzelanalysen sind in Anhang A1 dargestellt; SD: Standardabweichung; n.d.: nicht durchgeführt

Abbildung 13 zeigt exemplarisch die Clusteranalyse für die Schweinestallstaubprobe. Bei der Gel-zu-Gel-Vergleichsanalyse (mittlere Abbildung) konnte eine Kompression von vier Bandenprofilen nach der notwendigen Normalisierung aufgrund von Lauf-

weitenunterschieden beobachtet werden. Trotz sehr ähnlicher Bandenprofile und gleicher Bandenanzahl führte dies zu einem deutlich niedrigeren Übereinstimmungswert im Vergleich zu den Intratel- und Intratag-Analysen. Ermittelt wurden die durchschnittlichen Ähnlichkeitswerte durch Vergleich jedes einzelnen Profils untereinander (Anhang A1).

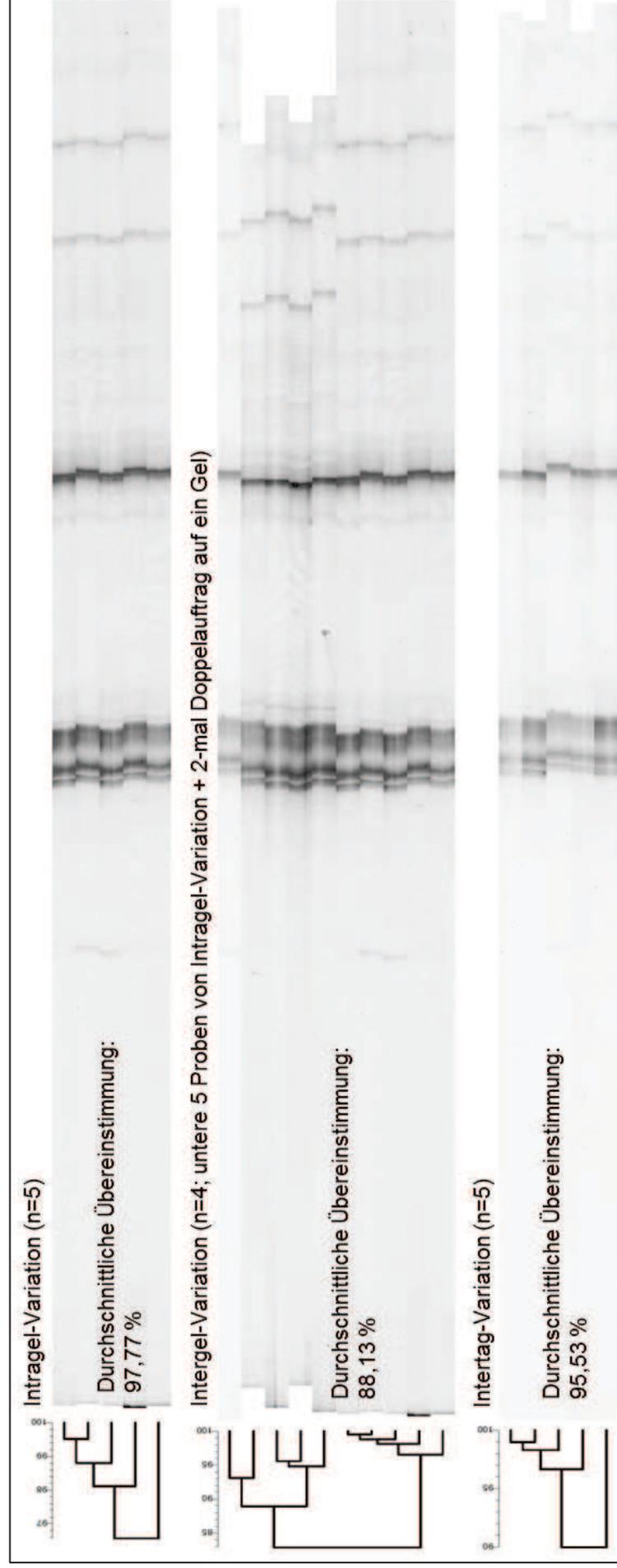


Abbildung 13: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der PCR-SCCP-Ergebnisse anhand Pearson-Cluster-Analyse (Probenmaterial Schweinestallstaub)
 Darstellung der durchschnittlichen Übereinstimmungswerte gemäß Profil-zu-Profil-Vergleich (s.a. Anhang A1); Werte für Pearson-Cluster mathematisch bedingt geringer.

4.2 Untersuchung der Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben

Die Analyse von Stall- und Hausstaubproben diente dem Nachweis der Anwendbarkeit der entwickelten PCR-SSCP Methode und der Parallelsequenzierungstechnologie auf die Untersuchung von „Feldproben“, d.h. die Verwendung von Staub als Matrix für die DNA-Extraktion zur Bestimmung der Diversität an Pilzen. Im Zuge dessen sollte überprüft werden, ob bei ausgewählten Gelbanden der PCR-SSCP-Analyse eine Identifizierung auf Speziesebene nach DNA-Isolierung aus dem Polyacrylamidgel und nachfolgender Sanger-Sequenzierung möglich ist. Zur Plausibilitätsprüfung der erhaltenen Ergebnisse wurde ein Vergleich mit kulturellen Untersuchungen angestellt. Als Probenmaterial wurden die Proben aus der Reproduzierbarkeitsstudie (s. Punkt 3.2.3.5) verwendet.

4.2.1 PCR-SSCP-Analyse

Die PCR-SSCP-Analyse (Abbildung 14) zeigte eine Vielzahl starker und schwacher Banden je Bandenprofil und die Profile unterschieden sich deutlich voneinander. In einem ersten Schritt wurde die Möglichkeit der Bestimmung auf Speziesebene von aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnittenen Banden und der daraus isolierten DNA untersucht. Hierfür wurden zehn dominante Banden – jeweils drei von den Profilen der Hühnerstall- und Kuhstallstaubprobe sowie jeweils zwei von den Profilen der Schweinestall- und Matratzenstaubprobe – ausgewählt (Abbildung 14). Zwei Doppelbanden (Bande B + D) wurden ausgeschnitten, da hier eine Trennung aufgrund der sehr ähnlichen Laufweite im Polyacrylamidgel nicht möglich war.

In allen zehn Fällen war eine Bestimmung auf Speziesebene möglich. In keinem Fall wurde pflanzliche DNA gefunden, was vermutlich durch die Vorselektion des 570-590 bp Fragments erreicht wurde (s. Punkt 3.2.3.4). In der Hühnerstallstaubprobe wurde *Microdochium nivale* (Bande A, 99 %; GenBank Nummern s. Abbildung 14) und *Cryptococcus victoriae* (Bande C, 100 %) nachgewiesen. *Candida cabralensis* (Bande D, 99 %) und *Candida catenulata* (Bande E, 100 %) wurden in der Schweinestallstaubprobe gefunden. Die Spezifikation der beiden ausgeschnittenen Banden aus dem Bandenprofil des Matratzenstaubs ergab *Alternaria alternata* (Bande F, 100 %) und *Pseudotaeniolina globosa* (Bande G, 99 %). Alle drei Banden der Kuhstallstaubprobe wurden als *Cladosporium* spp. bestimmt – *Cladosporium sphaerospermum* (Bande H + I, 98 + 100 %) und *Cladosporium cladosporioides* (Bande J,

100 %). Alle drei Banden lagen jedoch nicht auf Höhe von Speziestandard *Cladosporium herbarum* (DSM 63422), zeigten mit diesem allerdings Sequenzüberstimmungen von 96 % (Bande H), 97 % (Bande I) und 98 % (Bande J). Untereinander waren die Sequenzen zu 98 % (Bande H + I), 96 % (Bande H + J) sowie 97 % (Bande I + J) identisch. Des Weiteren zeigten die Banden H und J ähnliche, jedoch minimal längere Laufweiten als die Speziestandard-Pilze *Eurotium amstelodami* (DSM 62629) und *Alternaria alternata* (DSM 1102). Sequenzvergleiche ergaben, dass die Sequenz von *Cladosporium sphaerospermum* (Bande H) eine 90%ige Übereinstimmung mit einem mittleren Teilstück von 224 Nukleotiden (nt) sowie eine 100%ige Übereinstimmung in den letzten 61 nt inklusive des Reverse-Primers ITS4 mit *Eurotium amstelodami* besitzt. Die Sequenz von *Cladosporium cladosporioides* (Bande I) wies eine 100%ige Übereinstimmung mit den ersten 32 (inklusive Forward-Primer ITS1) und den letzten 58 nt (inklusive Reverse-Primer ITS4) sowie eine 93%ige Übereinstimmung mit einem mittleren Teilstück von 201 nt mit einer *Alternaria alternata* Datenbanksequenz (GenBank: GQ121322.2) auf.

Nicht-pilzlichen Ursprungs war laut Sanger-Sequenzierung Bande B (*Dermanyssus gallinae*, rote Vogelmilbe, 99 %) der Hühnerstallstaubprobe. Bisher war unbekannt, dass mit Primerpaar ITS1/ITS4 auch die ITS-Region von der Vogelmilbe amplifiziert wird. Die hierbei gewählte Doppelbande wies nahezu die identische Laufweite im Polyacrylamidgel wie Speziestandard *Wallemia sebi* (DSM 5329) auf. Der direkte Sequenzvergleich ergab jedoch nur eine Übereinstimmung der vorliegenden Sequenzen im Bereich der Forward- und Reverse-Primer.

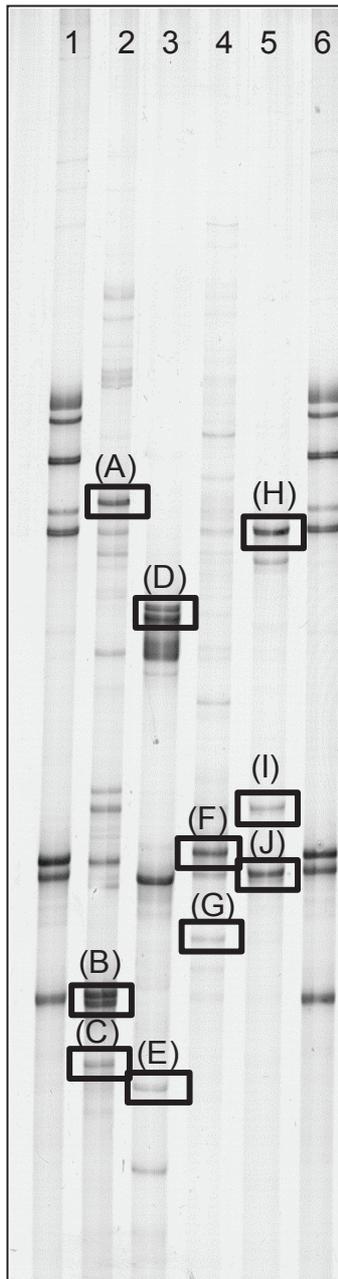


Abbildung 14: PCR-SSCP-Analyse von Stall- und Matratzenstaubproben zum Nachweis der Funktionalität der Methode

Auftragsreihenfolge:

1: Speziesstandard; 2: Hühnerstallstaub; 3: Schweinestallstaub;

4: Matratzenstaub; 5: Kuhstallstaub; 6: Speziesstandard

Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung:

(A): *Microdochium nivale*: NCBI / CBS: DSM 62278

(B): *Dermanyssus gallinae*: NCBI: GQ129212.1 / CBS: ROL2

(C): *Cryptococcus victoriae*: NCBI: AM160647.1 / CBS: HB1221

(D): *Candida cabralensis*: nur CBS: CBS 11679

(E): *Candida catenulata*: NCBI / CBS: CBS 565

(F): *Alternaria alternata*: NCBI: HQ380767.1 / CBS: DTO109-E4

(G): *Pseudotaeniolina globosa*: NCBI: HQ115663.1 / CBS: CBS109889

(H): *Cladosporium sphaerospermum*: NCBI: AF455481.1 / CBS: DTO117-H2

(I): *Cladosporium sphaerospermum*: NCBI / CBS: s. (H)

(J): *Cladosporium cladosporioides*: NCBI: AF455525.1 / CBS: DTO004-C3

4.2.2 Kulturelle Untersuchungen

Die durchgeführten Untersuchungen auf Sabouraud-2 % Glucose-Agar und DG18-Agar bestätigten die Ergebnisse der PCR-SSCP-Analyse im Allgemeinen. So war eine Zuordnung der dominanten Genera zu den Ergebnissen der PCR-SSCP-Analyse in vielen Fällen möglich. Beim Schweinestallstaub überwucherte *Mucor* sp. die Sabouraud-Agarplatte, sodass hier keine weiteren Pilze identifiziert werden konnten. Da eine weitere Differenzierung der weißen Hefen nicht vorgenommen wurde, war eine Aussage über das Vorkommen der bei der PCR-SSCP-Analyse detektierten Hefen auf den Nährmedien nicht möglich. Tabelle 24 fasst die Ergebnisse der

kulturellen Untersuchungen im Vergleich zu den PCR-SSCP-Ergebnissen zusammen.

Tabelle 24: Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen der Stall- und Hausstaubproben im Vergleich zu den PCR-SSCP-Ergebnissen

Detektierte Genera	Hühnerstallstaub	Schweinestallstaub	Kuhstallstaub	Matratzenstaub
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	++ (Sab/DG)
<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	+ (Sab/DG)	-
<i>Candida</i> sp.	+	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	++ (Sab/DG)	+ (Sab/DG)
<i>Eurotium</i> sp.	-	-	-	+ (Sab/DG)
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	+ (Sab/DG)
<i>Geotrichum</i> sp.	+	-	-	-
<i>Mucor</i> sp.	-	+++ (Sab) ++ (DG)	+ (Sab/DG)	-
<i>Penicillium</i> sp.	-	+ (DG)	+ (Sab/DG)	+ (Sab/DG)
<i>Pichia</i> sp.	+	-	-	-
weiße Hefen (nicht weiter differenziert)	++ (Sab/DG)	+ (DG)	-	-

+: gewachsen, -: nicht gewachsen, ++: dominant, +++: Platte überwuchert; Sab: Sabouraud-Agar, DG: DG18-Agar. Übereinstimmungen mit PCR-SSCP-Analyse fett gedruckt.

4.2.3 Parallelsequenzierung

Für die Untersuchung der Stall- und Hausstaubproben mittels Parallelsequenzierung wurden zusätzlich zu den, bereits oben erwähnten, vier Staubproben noch zwei weitere Matratzenstaubproben inkludiert. Die sechs Proben wurden als natives DNA-Extrakt (inkl. pflanzlicher DNA und Fragmentgrößen von ca. 350 bp; s. Punkt 3.2.3.4) und als PCR-Amplifikat (570-590 bp Fragment) vergleichend eingesetzt. In einem ersten Schritt wurden zunächst Unterschiede und Übereinstimmungen zwischen den beiden Probenvorbereitungsstrategien bestimmt, anschließend die dominanten Spezies je Probenquelle ermittelt und mit den Ergebnissen der PCR-SSCP-Analyse und den kulturellen Untersuchungen verglichen.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verwendung des nativen DNA-Extrakts und der PCR-Amplifikate hinsichtlich der Anzahl an Sequenzen gefunden (Abbildung 15). Erkennbare Unterschiede waren nur bei der Anzahl an Sequenzen mit einer Länge von 300 bis 399 nt vorhanden, welche bei dem nativen DNA-Extrakt mehr als doppelt so häufig vorkamen; dies war hauptsächlich bei den Matratzenstaubproben zu beobachten (Abbildung 16). Zudem wurde bei der Verwendung der ITS1/ITS4-PCR-Amplifikate nur mit dem 570-590 bp Fragment weitergearbeitet (s.a. Punkt 3.2.3.4), sodass andere Fragmentgrößen nicht mehr oder nur methodisch bedingt vorhanden sein konnten.

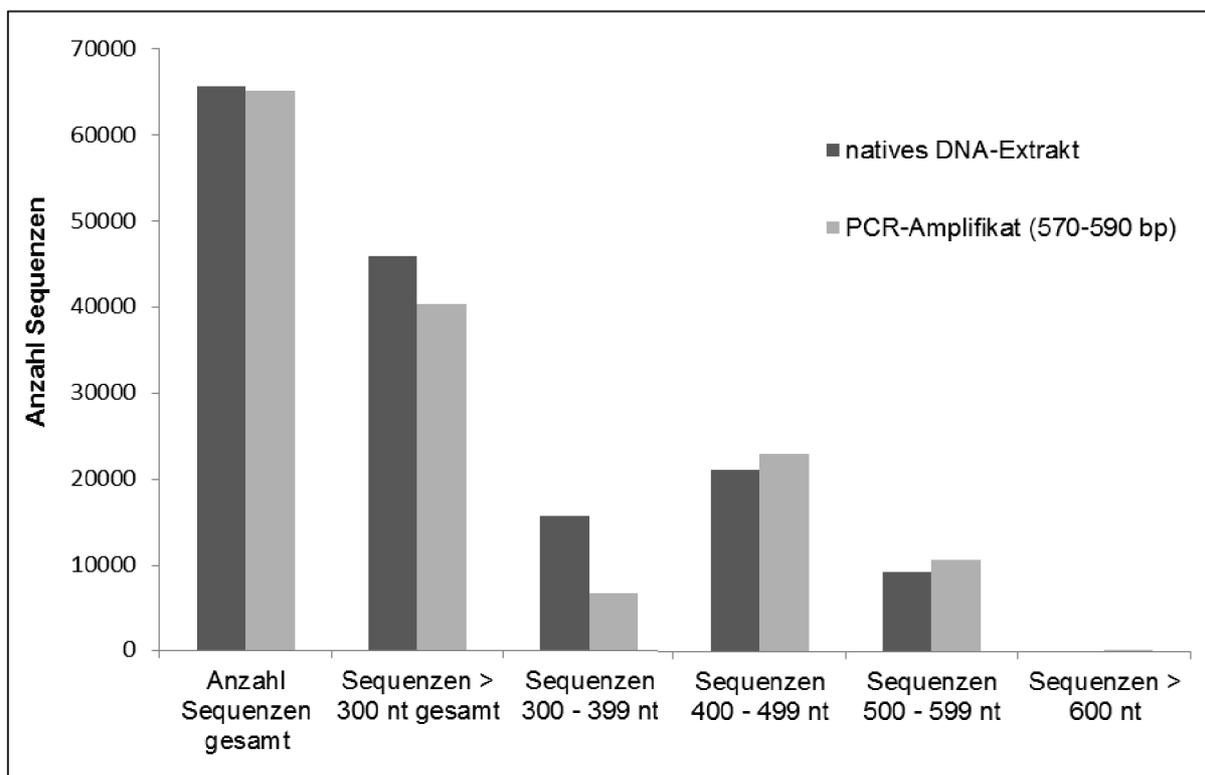


Abbildung 15: Vergleichsanalyse von nativem DNA-Extrakt und PCR-Amplifikat (570-590 bp Fragment) mittels Parallelsequenzierung (GS Junior, ROCHE)

nt: Nukleotide

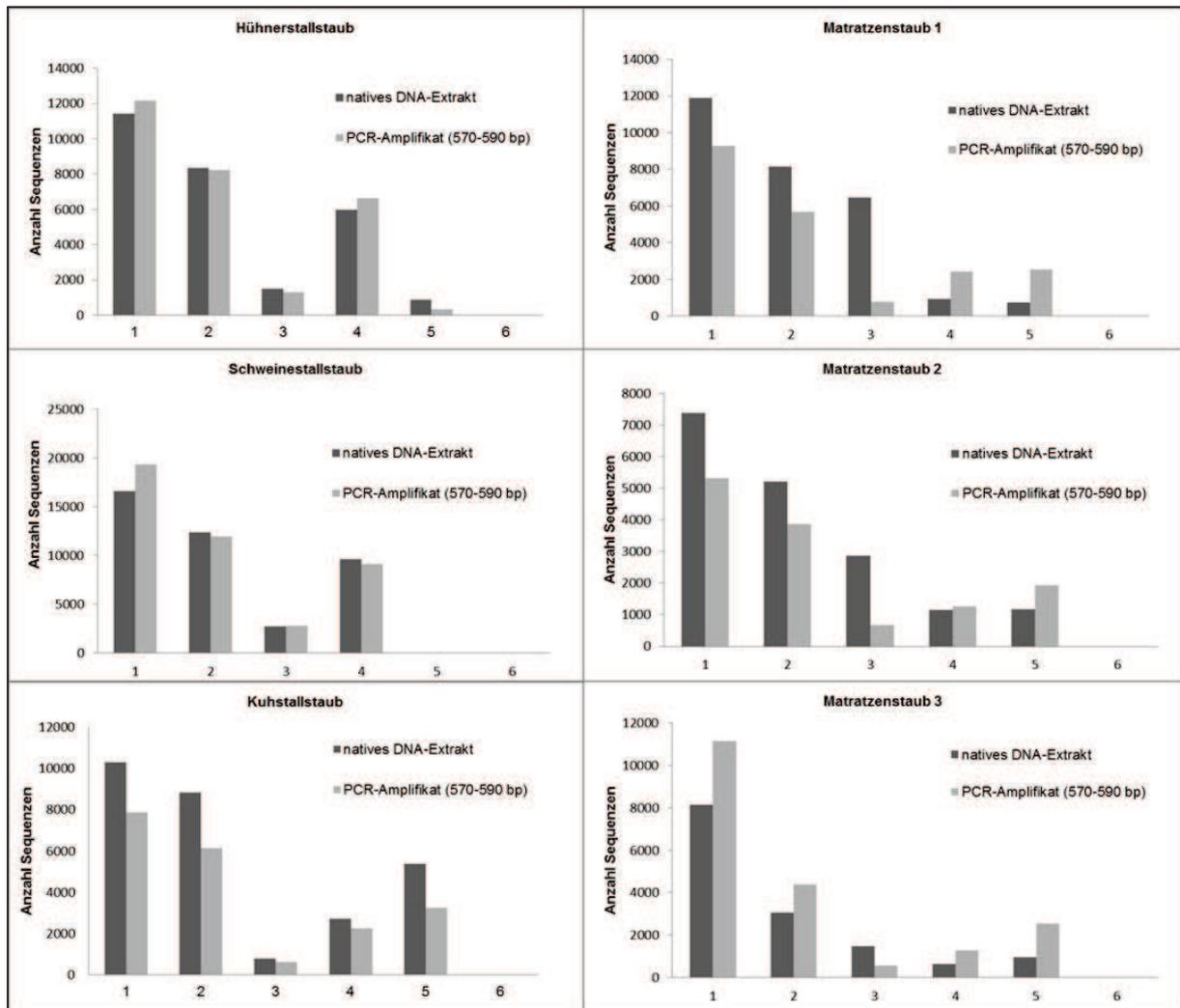


Abbildung 16: Parallelsequenzierung (GS Junior, ROCHE) von nativen DNA-Extrakten und PCR-Amplifikaten (570-590 bp) unterschiedlicher Herkunft im Vergleich

1: Anzahl Sequenzen gesamt; 2: Sequenzen > 300 nt; 3: Sequenzen mit 300-399 nt; 4: Sequenzen mit 400-499 nt; 5: Sequenzen mit 500-599 nt; 6: Sequenzen > 600 nt; nt: Nukleotide.

Dies spiegelt sich auch beim Vergleich der dominanten Spezies je Probenquelle wider. Unterschiede waren nur in Bezug auf die Auffindung von *Candida* sp. (Sequenzlänge 300-399 nt) bei den nativen DNA-Extrakten gegeben, welche, aufgrund der Selektion des 570-590 bp Fragments bei den PCR-Amplifikaten, hierbei in den meisten Fällen nicht mehr zu finden waren (Tabelle 25). Bezüglich der dominanten Schimmelpilzspezies wurden in der Regel keine Unterschiede festgestellt. Die Auswertung mittels MS Excel ‚Teilergebnis‘ und UCLUST in QIIME führte in allen Fällen zu denselben Ergebnissen. 298 OTUs wurden insgesamt gefunden. *Epilcoccum nigrum* war in allen Proben stark vertreten. Zudem wurden analog zur PCR-SSCP-Analyse auch beim Parallelsequenzierungsansatz DNA-Sequenzen der roten

Vogelmilbe (*Dermanyssus gallinae*) bei der Hühnerstallstaubprobe sowie zusätzlich auch bei der Matratzenstaubprobe 2 und der Schweinestallstaubprobe gefunden (Tabelle 25). Zudem zeigten sich auch verschiedene *Cryptococcus* spp. als weit verbreitet. Mit Ausnahme der Schweinestallstaubprobe wurde dieses Genus in allen Proben nachgewiesen.

Tabelle 25: Vergleich der dominanten Spezies bei der Parallelesequenzierung (GS Junior, ROCHE) von nativen DNA-Extrakten und PCR-Amplifikaten (570-590 bp Fragment) unterschiedlicher Herkunft

Probenquelle	Natives DNA-Extrakt	PCR-Amplifikat (570-590 bp Fragment)
Matratze 1	<i>Candida</i> sp. / <i>deformans</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Alternaria alternata</i> / <i>brassicae</i> <i>Ulocladium septosporum</i>	<i>Alternaria alternata</i> / <i>brassicae</i> <i>Ulocladium septosporum</i> <i>Epicoccum nigrum</i>
Matratze 2	<i>Candida</i> sp. / <i>deformans</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Cryptococcus heimaeyensis</i> / <i>victoriae</i> . <i>Dermanyssus gallinae</i> <i>Geotrichum candidum</i> / <i>geotrichum</i> <i>Trichosporon jirovecii</i>	<i>Epicoccum nigrum</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Cryptococcus heimaeyensis</i> / <i>victoriae</i> <i>Candida</i> sp. <i>Eurotium amstelodami</i> / <i>repens</i> <i>Phoma herbarum</i>
Matratze 3	<i>Candida</i> sp. <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Galactomyces geotrichum</i> <i>Cryptococcus</i> sp. / <i>dimmenae</i> <i>Dioszegia crocea</i> <i>Bullera globispora</i> <i>Didymella exitialis</i>	<i>Epicoccum nigrum</i> <i>Phoma herbarum</i> <i>Cryptococcus victoriae</i> <i>Bullera globispora</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> . <i>Alternaria alternata</i> / <i>brassicae</i> <i>Galactomyces geotrichum</i>
Kuhstall	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Cl. sphaerospermum</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Cryptococcus carnescens</i> <i>Phoma herbarum</i> <i>Didymella exitialis</i> <i>Microdochium nivale</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Cl. sphaerospermum</i>
Hühnerstall	<i>Dermanyssus gallinae</i> <i>Microdochium nivale</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Didymella exitialis</i> <i>Cryptococcus victoriae</i> <i>Eurotium amstelodami</i>	<i>Dermanyssus gallinae</i> <i>Microdochium nivale</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Cryptococcus victoriae</i> <i>Didymella exitialis</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>
Schweinestall	<i>Candida cabralensis</i> <i>Candida catenulate</i> <i>Dermanyssus gallinae</i> <i>Microdochium nivale</i> <i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Candida cabralensis</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Dermanyssus gallinae</i>

Anordnung der Pilzspezies nach Häufigkeit je Probe; Auswertung der häufigsten, identischen Sequenzen mittels MS Excel ‚Teilergebnis‘ und von 298 OTU-Sequenzen nach Zusammenfassung mit UCLUST in QIIME

Laut Herstellerangaben sollte ein maximaler Fragmentlängenunterschied von 150 bp für den Einsatz der Parallelsequenzierung mit dem GS Junior (ROCHE) eingehalten werden. Da dieses Maximum bei der Verwendung des nativen DNA-Extrakts überschritten und keine signifikanten Unterschiede zu den PCR-Amplifikaten gefunden wurden, sind die folgenden Parallelsequenzierungsversuche mit den vorselektierten Proben durchgeführt worden.

4.2.4 Vergleich von PCR-SSCP-Analyse, Parallelsequenzierung und kulturellen Untersuchungen von Stall- und Hausstaubproben

Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse im Vergleich der drei Analysemethoden – Kultur, PCR-SSCP und Parallelsequenzierung. Der Vergleich wurde mit den drei Stallstaub- und einer Matratzenstaubprobe (Probe 1) durchgeführt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der jeweiligen Methode durch die Ergebnisse der anderen Techniken bestätigt werden. In allen Fällen stimmten die detektierten, dominanten Pilzspezies überein.

Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung von Stall- und Hausstaubproben mittels PCR-SSCP, Parallelsequenzierung und Kultur.

Probenquelle	PCR-SSCP-Analyse	Parallelsequenzierung	Kultur
Matratze	<i>Alternaria alternata</i> <i>Pseudotaeniolina globosa</i>	<i>Candida</i> sp. / <i>deformans</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Alternaria alternata</i> / <i>brassicae</i> <i>Ulocladium septosporum</i>	<i>Alternaria</i> sp. / <i>Epicoccum</i> sp. / <i>Cladosporium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.
Kuhstall	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> <i>Cl. cladosporioides</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Cl. sphaerospermum</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Cryptococcus carnescens</i> <i>Phoma herbarum</i> <i>Didymella exitialis</i> <i>Microdochium nivale</i>	<i>Cladosporium</i> sp. / <i>Penicillium</i> sp. / <i>Aspergillus</i> sp. / <i>Mucor</i> sp.
Hühnerstall	<i>Microdochium nivale</i> <i>Dermanyssa gallinae</i> <i>Cryptococcus victoriae</i>	<i>Dermanyssa gallinae</i> <i>Microdochium nivale</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Didymella exitialis</i> <i>Cryptococcus victoriae</i> <i>Eurotium amstelodami</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	weiße Hefen (<i>Candida</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Pichia</i> sp., weitere nicht weiter differenziert)
Schweine-stall	<i>Candida cabralensis</i> <i>C. catenulata</i>	<i>Candida cabralensis</i> <i>C. catenulata</i> <i>Dermanyssa gallinae</i> <i>Microdochium nivale</i> <i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Mucor</i> sp. weiße Hefen (nicht weiter differenziert)

Parallelsequenzierung/Kultur: Anordnung der Pilzspezies nach Häufigkeit je Probe.

4.3 Molekularepidemiologische Untersuchungen zur Feststellung von Assoziationen zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko bei Schulkindern (GABRIEL)

844 Matratzenstaubproben (stratifizierte Stichprobe der GABRIEL-Studie) von bayerischen Schulkindern aus dem bäuerlichen Umfeld mit oder ohne ärztlich diagnostiziertem Asthma wurden untersucht (s. Punkt 3.1.2). Die DNA-Extraktion mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) und die PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 war in allen Fällen erfolgreich. Die weitere Analyse mittels PCR-SSCP und Parallelesequenzierung wurde mit den spezifischen PCR-Produkten (570-590 bp-Fragment) zur Vermeidung pflanzlicher Störfaktoren und von Größeneffekten bei beiden Technologien durchgeführt (s.a. Punkt 3.2.3.4). Allerdings wurde damit eine Nichtberücksichtigung von manchen Hefen mit einer ITS-Fragmentlänge von ca. 350 bp in Kauf genommen.

4.3.1 PCR-SSCP-Analyse von Matratzenstaubproben (GABRIEL)

Mittels PCR-SSCP-Analyse wurden von den oben genannten Proben 844 Bandenprofile im Polyacrylamidgel erstellt. Diese verteilten sich auf insgesamt 54 Gele. Die Ergebnisse der statistischen Analyse der densitometrischen Werte und der Band-matching-Informationen sind im Folgenden dargestellt. Die Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen beispielhaft ein Polyacrylamidgel der durchgeführten Studie sowie die Übersetzung der Bandeninformation in Dichtewerte von drei Proben desselben Gels im Vergleich zu dem eingesetzten Speziessstandard.

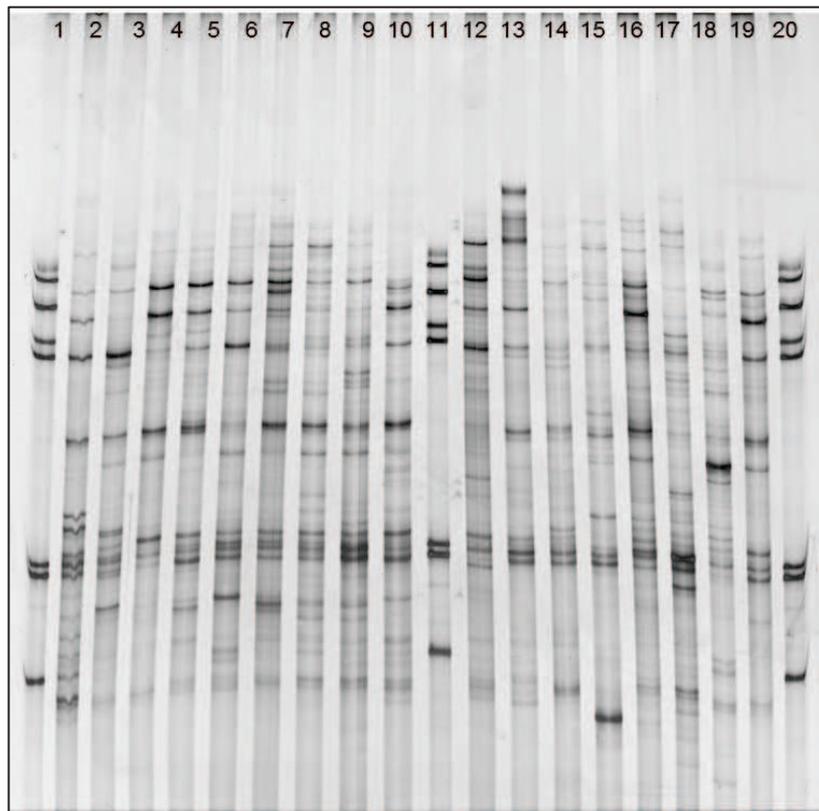


Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung eines Polyacrylamidgels der PCR-SSCP-Analyse von 17 Matratzenstaubproben (GABRIEL)

Auftragsreihenfolge: 1: Speziesstandard; 2-10: Matratzenstaubproben; 11: Speziesstandard; 12-19: Matratzenstaubproben; 20: Speziesstandard.

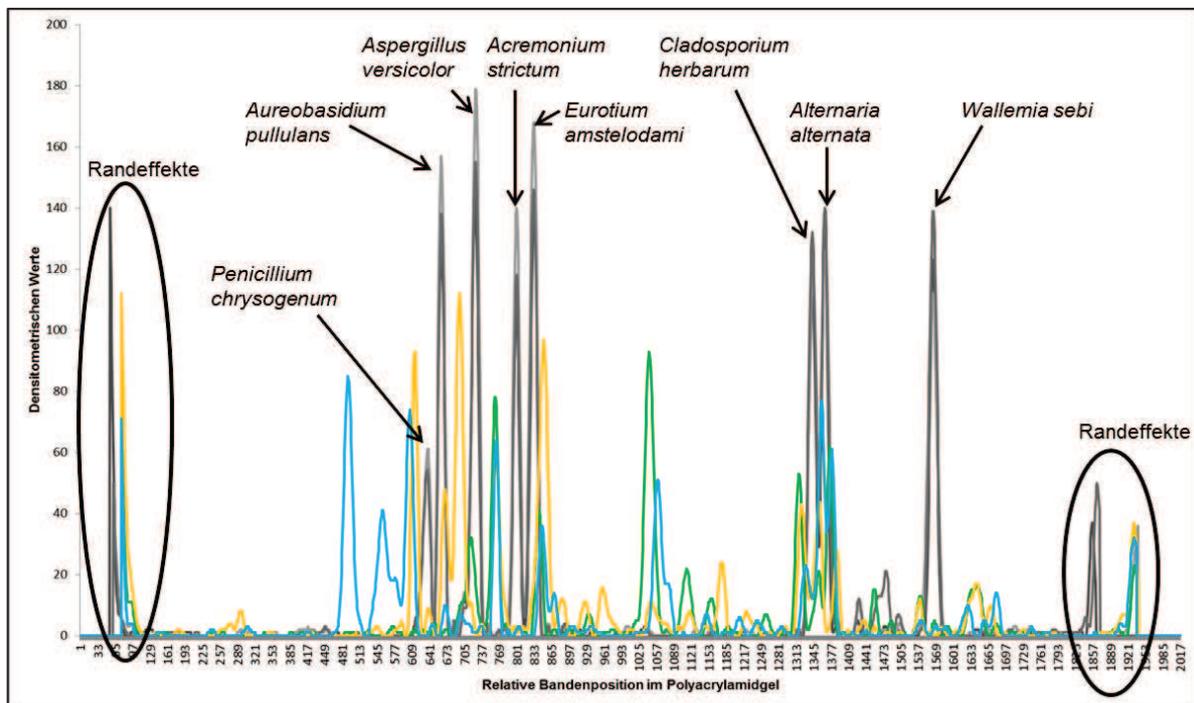


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung der densitometrischen Werte von sechs Bandenprofilen aus Abbildung 17

grau: Speziesstandards (3x); grün: Probe 10; orange: Probe 12; blau: Probe 13 (vgl. Abbildung 17).

4.3.1.1 Densitometrische Auswertung der Bandeninformationen

Die Dichtewerte der einzelnen Bandenpositionen der 844 PCR-SSCP-Profile wurden qualitativ (dichotomisierte Variablen mit Cut-off 5 und 10) und quantitativ (logarithmierte Variablen, kontinuierlich verwendet) ausgewertet. Hierfür wurden die Bandenprofile nach Bauernhofursprung adjustiert und nach dem Vorhandensein einer Asthma-Diagnose beim jeweiligen Kind sortiert. Die statistische Auswertung ergab zahlreiche signifikante Bandenpositionen hinsichtlich „Asthmaprotektion“ (OR < 1; inverse Assoziation) bzw. „Asthmainduktion“ (OR > 1; positive Assoziation). Die Assoziationen der relativen Bandenpositionen im Polyacrylamidgel bezüglich Asthma/asthmatischer Bronchitis sind in Abbildung 19 dargestellt. Hierbei wurden die OR gegen die Position der Bande im Gel aufgetragen und signifikante Assoziationen ($p < 0,05$) mit einem Sternchen versehen.

Die spezifischen, signifikanten Bandenpositionen sind in Tabelle 27 im Detail dargestellt. Um diejenigen Bandenpositionen mit den stärksten Assoziationen – positiv oder invers – bezüglich Asthma/asthmatischer Bronchitis bestimmen zu können, wurden Schnittmengen aus den Ergebnissen der drei Analysevarianten gebildet (Tabelle 28). Eine Schnittmenge aus allen drei Varianten lag nicht vor, sodass der Fokus auf Schnittmengen aus jeweils zwei der drei Varianten gelegt wurde. Dabei stellte sich heraus, dass zudem keine Schnittmenge aus der dichotomisierten Auswertung mit Cut-off 10 und der kontinuierlichen Auswertung gebildet werden konnte. Aus diesem Grund wurden Bandenpositionen aus den Schnittmengen der dichotomisierten Auswertung mit Cut-off 5 und 10 sowie mit Cut-off 5 und der kontinuierlichen Auswertung als hoch-assoziativ eingestuft (Tabelle 28).

Nah aneinander liegende Gelpositionen wurden dabei als eine Gelposition betrachtet, da hier eine Separation der Banden im Polyacrylamidgel nicht möglich gewesen wäre. So wurden die Einzelpositionen 213, 214 und 220 zur Position 220 zusammengefasst; ebenso 1410 und 1411 zu 1410 und 621, 623, 624 und 627 zu 621/627. Bei letzterer Gelposition wurde aufgrund der unterschiedlichen Herkunft der Einzelpositionen 621, 623 und 624 sowie 627 bezüglich der Schnittmenge eine Doppelbezeichnung gewählt (Tabelle 28). Gelposition 1132 stellte eine klare Schnittmenge dar.

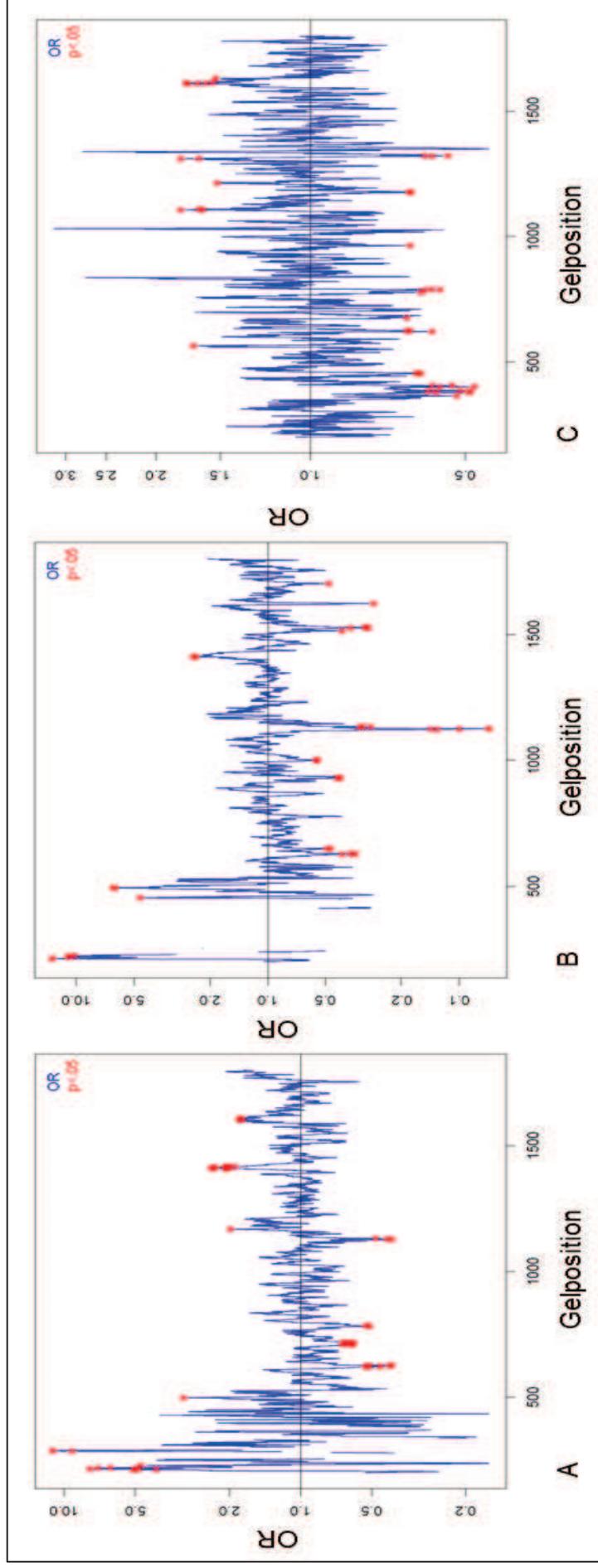


Abbildung 19: Assoziationen von Gelpositionen mit Asthma/asthmatischer Bronchitis (Densitometrie)

A: Asthma adjustiert für Bauernhof –Cut-off 5; B: Asthma adjustiert für Bauernhof –Cut-off 10; C: Asthma adjustiert für Bauernhof – kontinuierlich; *, p < 0,05

Tabelle 27: Gelpositionen mit signifikanter, positiver oder inverser Assoziation mit Asthma (Densitometrie)

	Positive Assoziation						Inverse Assoziation					
dichotomisiert / Cut-off 5	212	213	214	215	216	219	621	622	623	624	625	626
	220	228	286	287	288	498	627	710	711	712	713	714
	1168	1409	1410	1411	1412	1413	715	716	717	718	783	784
	1414	1415	1416	1417	1603	1604	1128	1129	1132			
	1606	1607										
dichotomisiert / Cut-off 10	213	214	220	221	222	223	627	628	629	630	649	650
	225	455	493	494	495	1410	929	930	931	1000	1001	1122
	1411						1123	1124	1125	1126	1132	1133
							1134	1513	1524	1525	1526	1527
							1528	1622	1701			
kontinuierlich (logarithmiert)	564	1106	1107	1109	1213	1310	364	377	378	383	384	387
	1311	1609	1610	1611	1612	1614	399	401	405	406	453	454
	1631						456	621	623	624	676	777
							786	788	789	964	1175	1178

Tabelle 28: Schnittmengen der dichotomisierten und kontinuierlichen Analysevarianten (Densitometrie)

	Positive Assoziation						Inverse Assoziation		
Cut-off 5 und 10	213	214	220	1410	1411		627	1132	
Cut-off 5 und kontinuierlich	---						621	623	624
Cut-off 10 und kontinuierlich	---						---		

Nach Kontrolle der Polyacrylamidgele bezüglich der Auswahl von Banden für die Sequenzierung musste die Gelposition 220 wieder ausgeschlossen werden, da an dieser Stelle keine Banden oder lediglich Artefakte wie Schmutzteilchen im Gel detektiert werden konnten. Somit blieben aus der densitometrischen Auswertung der Bandeninformation die drei Gelpositionen 1410 (positiv assoziiert) sowie 621/627 und 1132 (invers assoziiert).

4.3.1.2 Auswertung der Bandeninformation mittels der Bandmatching-Anwendung der Software GelCompar® II

Zusätzlich zu den densitometrischen Werten wurden die PCR-SSCP-Profile mittels der Bandmatching-Anwendung der Software GelCompar® II ausgewertet und dabei automatisch klassifiziert. Wie in Tabelle 16 dargestellt, wurden verschiedene Einstellungsvarianten der Bandmatching-Anwendung der Software getestet. Die Variante 1 war hierbei die von der Software vorgegebene Standardeinstellung. Da diese Auswertung in einer (zu) hohen Anzahl an definierten Banden resultierte, wurde versucht gleichzeitig sowohl die generelle Anzahl an definierten Banden als auch die Anzahl an ausgeschlossenen dominanten Banden zu minimieren. Dies wurde mittels der Varianten 11 und 12 erreicht. Tabelle 29 zeigt noch einmal die Einstellungen der beiden Varianten im Vergleich zur Standardeinstellung. Die beiden Varianten wurden im Folgenden parallel ausgewertet.

Tabelle 29: Ausgewählte Softwareeinstellungsvarianten für die Auswertung der Bandeninformation mittels Bandmatching (Software GelCompar® II)

Var	<i>Bandmatching</i>					<i>Bandenklassenfilter</i>			
	Opt	posT	Änderung zu Profilende	minH	minS	Profiling pro Klasse i.D.	rel. Fläche pro Klasse	minP	minF
1	0.5%	0.5%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
11	0.5%	0.5%	0%	1%	1%	5%	10%	5%	10%
12	0.5%	0.5%	0%	1%	1%	10%	15%	10%	15%

Var: Variante; Opt: Optimierung; posT: Positionstoleranz; minH: minimale Höhe/Größe; minS: minimale Fläche; i.D.: im Durchschnitt; rel.: relativ; minP: minimales Profiling; minF: minimale Fläche

Analog zur Auswertung der densitometrischen Werte wurden Bandenpositionen mit signifikanter Assoziation in Bezug auf Asthma/asthmatische Bronchitis mit denselben Analysevarianten (qualitativ und quantitativ) ermittelt. Bei der Bandmatching-Analyse wurden diese jedoch in Prozentwerten in Abhängigkeit der relativen Laufweite im Polyacrylamidgel (0 %: Gelanfang; 100 %: Gelende) ausgegeben. Die folgenden Tabellen Tabelle 30 bis Tabelle 32 zeigen die signifikanten Gelpositionen im Detail.

Tabelle 30: Mit Asthma assoziierte, signifikante Banden bei Auswertung der dichotomisierten Werte mit Cut-off 5 (Bandmatching)

Variante 11			Variante 12		
Gelposition	OR	p-value	Gelposition	OR	p-value
34,7 %	0,54	0,033	34,7 %	0,54	0,033
42,9 %	0,57	0,068	42,9 %	0,57	0,068
46,2 %	1,52	0,089			
53,0 %	1,55	0,062	53,0 %	1,55	0,062
77,2 %	0,60	0,082	77,2 %	0,60	0,082

Inverse Assoziationen sind fett gedruckt; OR: Odd's ratio; p-value: Signifikanzwert

Tabelle 31: Mit Asthma assoziierte, signifikante Banden bei Auswertung der dichotomisierten Werte mit Cut-off 10 (Bandmatching)

Variante 11			Variante 12		
Gelposition	OR	p-value	Gelposition	OR	p-value
34,7 %	0,54	0,033	34,7 %	0,54	0,033
42,9 %	0,57	0,068	42,9 %	0,57	0,068
46,2 %	1,53	0,087			
53,0 %	1,60	0,048	53,0 %	1,60	0,048
77,2 %	0,61	0,088	77,2 %	0,61	0,088

Inverse Assoziationen sind fett gedruckt; OR: Odd's ratio; p-value: Signifikanzwert

Tabelle 32: Mit Asthma assoziierte, signifikante Banden bei Auswertung der logarithmierten Werte und kontinuierlichen Verwendung der Variablen (Bandmatching)

Variante 11			Variante 12		
Gelposition	OR	p-value	Gelposition	OR	p-value
			0,6 %	0,15	0,000
34,7 %	0,89	0,055	34,7 %	0,89	0,055
42,9 %	0,88	0,080	42,9 %	0,88	0,080
53,0 %	1,13	0,028	53,0 %	1,13	0,028
70,6 %	1,15	0,097	70,6 %	1,15	0,097

Inverse Assoziationen sind fett gedruckt; OR: Odd's ratio; p-value: Signifikanzwert

Die Bildung der Schnittmenge aus den drei Analysevarianten ergab drei signifikant invers assoziierte Gelpositionen – 34,7 %, 42,9 % und 77,2 % – sowie eine Risiko-Gelposition (53,0 %) (Tabelle 33). Mit Ausnahme der Gelposition 77,2 % (nur bei den dichotomisierten Variablen) stellten die Ergebnisse zudem Übereinstimmungen aller drei Analysevarianten dar.

Tabelle 33: Schnittmenge der dichotomisierten und kontinuierlichen Analysevarianten (Band-matching)

	Variante 11	Variante 12	
Inverse Assoziation	34,7 %	34,7 %	Alle Analysevarianten
	42,9 %	42,9 %	Alle Analysevarianten
	77,2 %	77,2 %	Nur dichotomisierte Varianten
Positive Assoziation	53,0 %	53,0 %	Alle Analysevarianten

4.3.1.3 Sanger-Sequenzierung ausgewählter Banden der PCR-SSCP-Analyse

Von jeder signifikant mit Asthma assoziierten Gelposition der densitometrischen Auswertung der Bandeninformation (s. Punkt 4.3.1.1) sowie der Bandmatching-Analyse (s. Punkt 4.3.1.2) wurden mindestens drei Banden von unterschiedlichen Polyacrylamidgelen für die Sanger-Sequenzierung ausgewählt. Im weiteren Verlauf werden diese Proben folgendermaßen benannt: Gelposition-Probennummer (z.B. 1132-1). Eine Probennummer entspricht hierbei immer einer Staubprobe einer Kinder-matratze.

Die Zusammensetzung der, aus den ausgewählten Banden, isolierten ITS-DNA-Sequenzen, war in allen Fällen heterogen unterschiedlich starker Ausprägung. Damit waren in jeder Bande DNA-Sequenzen verschiedener Pilzspezies vertreten. Die Firma SEQUISERVE GmbH hat bei allen Proben die Hauptsequenz editiert; zum Teil waren die Proben allerdings für eine sinnvolle Editierung zu inhomogen. Abbildung 20 zeigt die Lage der einzelnen, signifikanten Gelpositionen beispielhaft für zwei Polyacrylamidgele. Die hier markierten Banden geben aber nicht in allen Fällen diejenigen wieder, die schlussendlich für die Sequenzierung ausgewählt wurden, da sie zum Teil zu schwach waren bzw. nicht eindeutig von umliegenden Banden separiert

werden konnten. Festzuhalten war, dass die statistische Analyse der densitometrischen Werte und der Bandmatching-Informationen unterschiedliche Ergebnisse lieferte.

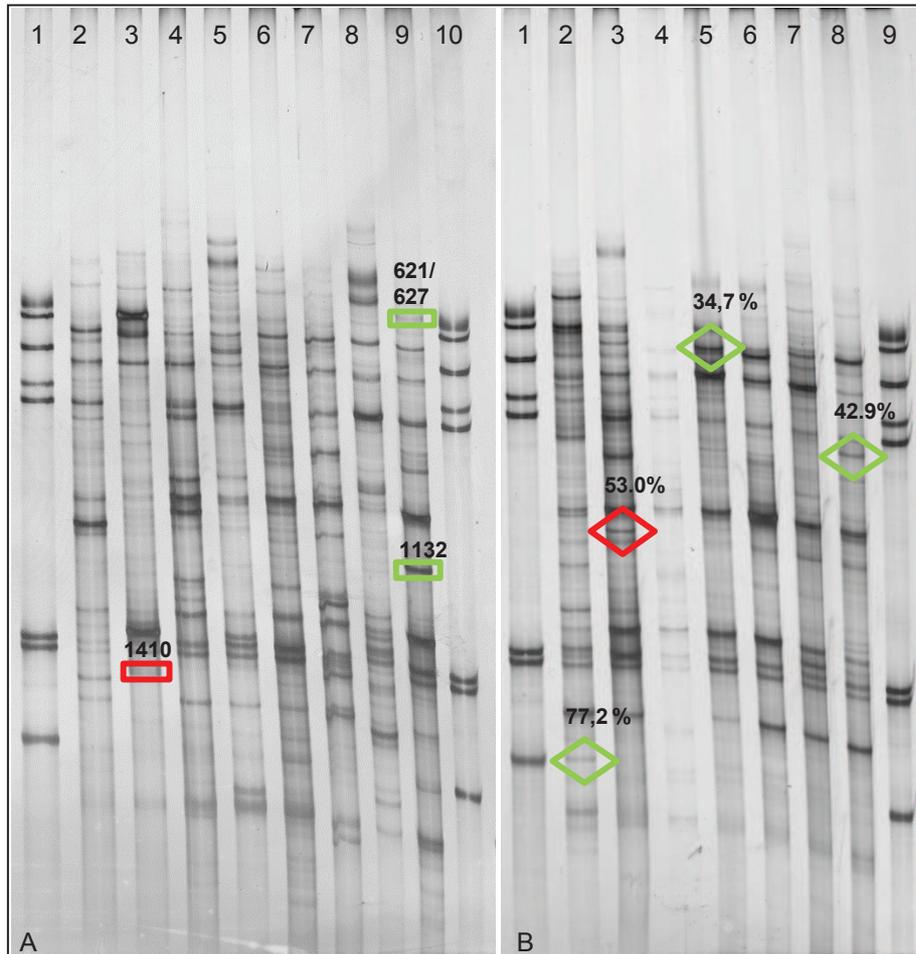


Abbildung 20: Beispielhafte Darstellung der ausgewählten, signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen/Banden

A: Darstellung der signifikanten Gelpositionen der densitometrischen Auswertung; grün: inverse Assoziation; rot: positive Assoziation; 1/10: Speziesstandard.

B: Darstellung der signifikanten Gelpositionen der Bandmatching-Analyse; grün: inverse Assoziation; rot: positive Assoziation; 1/9: Speziesstandard.

4.3.1.3.1 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach densitometrischer Auswertung der Bandeninformation

Für alle drei Gelpositionen wurden mehr als drei Banden von Profilen unterschiedlicher Matratzenstaubproben für die Sanger-Sequenzierung ausgewählt; für 1132 waren es vier, für 1410 fünf Banden. Zudem wurden von der Gelposition 621/627 insgesamt 16 Banden aus verschiedenen Bandenprofilen ausgeschnitten. Grund hierfür war die Herkunft der Gelpositionen 621 und 627 aus unterschiedlichen Schnittmengen der Analysevarianten (s. Punkt 4.3.1.1). Bei der Auswahl der Banden fiel auf, dass Banden nur zum Teil eindeutig einer der beiden Gelpositionen 621 und 627 zuzuordnen waren. Deshalb wurden vier Banden spezifisch für Gelposition 621, sechs Banden für Gelposition 627 sowie sechs Mischbanden ausgewählt. Durch die Mehrfachsequenzierung von Banden derselben Bandenposition sollten Übereinstimmungen der dominanten Sequenzen überprüft werden. Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung sind in Tabelle 34 gelistet.

Tabelle 34: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach densitometrischer Auswertung der Bandeninformation

Gelposition	Probe (≙ Kind)	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]
621/627	1	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	100	100
	2	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	100	100
	3	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	100	100
	4	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	100	100
	5	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	100	100
	6	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	100	99
	7	<i>Glyphium elatum</i> (CBS268.34)	98	100
	8	<i>Glyphium elatum</i> (CBS268.34)	98	100

 Fortsetzung Tabelle 34: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach densitometrischer Auswertung der Bandeninformation

Gel- position	Probe (\triangle Kind)	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]	
621/627	9	<i>Penicillium commune</i> (GQ458026.1)	100	100	
	10	<i>Penicillium lanosum</i> (EU833224.1)	100	99	
		<i>Penicillium nalgiovense</i> (CBS 352.48)	100	100	
	11	<i>Penicillium lanosum</i> (GU565150.1)	100	99	
		<i>Penicillium nalgiovense</i> (CBS 352.48)	100	100	
	12	<i>Penicillium lanosum</i> (EU833224.1)	100	99	
		<i>Penicillium nalgiovense</i> (CBS 352.48)	100	100	
	13	<i>Aureobasidium pullulans</i> (HM849619.1)	100	99	
	14	<i>Phialophora europaea</i> (EF540756.1)	100	99	
	15	Unkultivierter Pilz (HM164580.1)	96	96	
	16	nicht editierbar	---	---	
	1132	1	unkultivierte <i>Pleosporales</i> sp. (GU909871.1)	97	95
		2	unkultivierter Pilz (EU718669.1)	100	99
		3	unkultivierter Pilz (EU852358.1)	99	98
		4	<i>Ascomycota</i> sp. (AJ972820.1)	100	99
	1410	1	<i>Saccharicola bicolor</i> (AF455415.1)	100	99
2		<i>Ascomycota</i> sp. (HQ607922.1)	100	99	
3		<i>Pseudotaeniolina globosa</i> (HQ115663.1)	93	99	

Fortsetzung Tabelle 34: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach densitometrischer Auswertung der Bandeninformation

Gelposition	Probe (≙ Kind)	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]
1410	4	<i>Didymella exitialis</i> (EU167564.1)	100	100
	5	Unkultivierte <i>Ascomycota</i> sp. (EU520640.1)	72	84

Inverse Assoziationen sind fett gedruckt. GenBank-Nummern in Klammern unterhalb des Genus/der Spezies.

Gelposition 1132 (inverse Assoziation) ließ keine definitive Aussage bezüglich Genus/Spezies zu. Hier konnten in drei Fällen in den Datenbanken nur bisher nicht-kultivierte Pilze gefunden werden. Im vierten Fall war lediglich eine Aussage über *Ascomycota* sp. möglich. Bei Gelposition 1410 könnte es sich, den Informationen der Datenbanken entsprechend, zumindest bei drei von fünf Proben um *Didymella exitialis*, *Pseudotaeniolina globosa* und *Saccharicola bicolor* handeln, welche hiermit möglicherweise mit Asthmainduktion in Verbindung gebracht werden konnten.

Als mögliche Asthma-protective Kandidaten könnten *Exophiala* sp., mehrere *Penicillium* spp., *Glyphium elatum*, *Aureobasidium pullulans* sowie *Phialophora europaea* in Frage kommen (Gelposition 621/627). Dabei zeigte sich, dass die Gelpositionen 621 und 627 zusammen betrachtet werden müssen. Gelposition 621 war zwar eindeutig mit *Exophiala* sp. assoziiert. Allerdings konnten auch zwei weitere Banden – eine von Gelposition 627 sowie eine Mischbande (621/627) – als *Exophiala* sp. verifiziert werden (Tabelle 34, Gelposition 621/627; Proben 1-6). Diese sechs Sequenzen zeigten untereinander eine Übereinstimmung von 99 bis 100 %. Zweithäufigste Vertreter der Gelposition 621/627 waren verschiedene *Penicillium* spp. (Tabelle 35, Gelposition 621/627, Proben 9-12). Als Datenbankergebnisse mit den höchsten Übereinstimmungswerten erwiesen sich hierbei Sequenzen von *P. lanosum* (Ergebnis bei NCBI-BLAST) bzw. *P. nalgiovense* (Ergebnis bei CBS-KNAW) sowie *P. commune*. Zudem war bei der Datenbanksuche jeweils *P. chrysogenum* der häufigste Vertreter unter den ersten 100 Treffern. Diese vier Sequenzen zeigten Übereinstimmungen von 99 bis 100 % untereinander sowie 99 % zum Speziesstandard-Pilz *P. chrysogenum* (DSM 844). Beim Vergleich der Sequenzen von *Exophiala* sp. und *Penicillium* spp. ergab sich eine Übereinstimmung von 76 %. Auch die beiden *Gly-*

phium elatum Sequenzen zeigten untereinander eine 99%ige Übereinstimmung. Bei der NCBI-BLAST-Recherche wurden Übereinstimmungen von 93 % mit der *Exophiala* sp.-Sequenz von Gelposition 621 gefunden. Beim Vergleich mit den *Penicillium* spp.-Sequenzen ergaben sich Übereinstimmungen in drei verschiedenen Teilabschnitten von 89 % (194 Basen), 96 % (68 Basen) und 82 % (105 Basen) und damit keine phylogenetische Ähnlichkeit. Die Sequenz von *Aureobasidium pullulans* (Tabelle 34; Gelposition 621/627, Probe 13) wies Übereinstimmungen mit *Exophiala* sp. und *Glyphium elatum* von 81 %, mit *Penicillium* spp. von 77 % und mit *Phialophora europaea* in drei kurzen Teilabschnitten auf, sodass diese unabhängig von den anderen betrachtet werden musste.

Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse bei Gelposition 621/627, mit unterschiedlichen Kandidaten für einen potentiell Asthma-protektiven Effekt, wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt: (1) Klärung der genauen Lage der einzelnen, ausgewählten Banden bezüglich des Speziesstandards und (2) Versuch der Verbesserung der Aussagekraft bei den Kandidaten *Exophiala* sp. und *Penicillium* spp. hinsichtlich einer Bestimmung auf Speziesebene.

(1) In einem ersten Schritt wurden die 16 ausgeschnittenen Banden (621/627–1-16) und die daraus erhaltene DNA erneut in die PCR-SSCP-Analyse eingesetzt und die Bedingungen für eine bessere Auftrennung der Banden im Polyacrylamidgel abgeändert (Abbildung 21). Eine Auftrennung der Einzelbanden in mehrere Banden aufgrund von möglicherweise unterschiedlichen Sequenzen verschiedener Pilzspezies innerhalb einer Probenbande erfolgte nur bei einer Probe (621/627-13), die als Ergebnis *Au. pullulans* lieferte. Hier waren zwei identisch starke Banden, auf identischer Laufweite mit den Speziesstandards *P. chrysogenum* und *Au. pullulans*, zu erkennen. Bei der Sanger-Sequenzierung wurde die Sequenz von *Au. pullulans* als dominant detektiert. Außerdem konnte demonstriert werden, dass die sechs Proben mit Ergebnis *Exophiala* sp. eindeutig oberhalb des Speziesstandards *P. chrysogenum* (DSM 844) lokalisiert waren, also eine kürzere Laufweite aufwiesen, während die Proben mit *Penicillium* spp. als Hauptsequenz eine identische Laufweite wie der Speziesstandard zeigten. Dies bestätigte die bereits vorgenannten Ergebnisse der Analyse der originalen Polyacrylamidgele. Allerdings war auch ein Unterschied innerhalb der *Exophiala* sp.-Banden in Abhängigkeit der ursprünglichen Gelposition ersichtlich. So waren die vier Banden, die eindeutig Gelposition 621 zuzuordnen waren (621/627–1-4), sowie die Mischbande (621/627-5) auf einer

Laufweite zu finden. Im Gegensatz dazu wies die sechste Probe (621/627-6), eindeutig auf Gelposition 627, nach neuerlicher PCR-SSCP-Analyse eine etwas längere Laufweite auf, die jedoch immer noch kürzer als diejenige des Speziesstandards war. Die Proben mit einer dominanten Anzahl an Sequenzen von *G. elatum* und *Ph. europaea* zeigten identische Laufweiten wie die des *P. chrysogenum* Speziesstandards. Mit Hilfe der zusätzlichen PCR-SSCP-Analyse konnte zudem die Vermutung aufgestellt werden, dass die beiden, über Sanger-Sequenzierung nicht näher bestimmbar, Proben (621/627-15 und -16) aufgrund ihrer Laufweite einerseits ebenfalls zu den *Exophiala* sp.-Ergebnissen (Abbildung 21; Laufspur 17; Probe 15) sowie andererseits zu den *Penicillium* spp.-Ergebnissen (Abbildung 21, Laufspur 18; Probe 16) hinzugerechnet werden können.

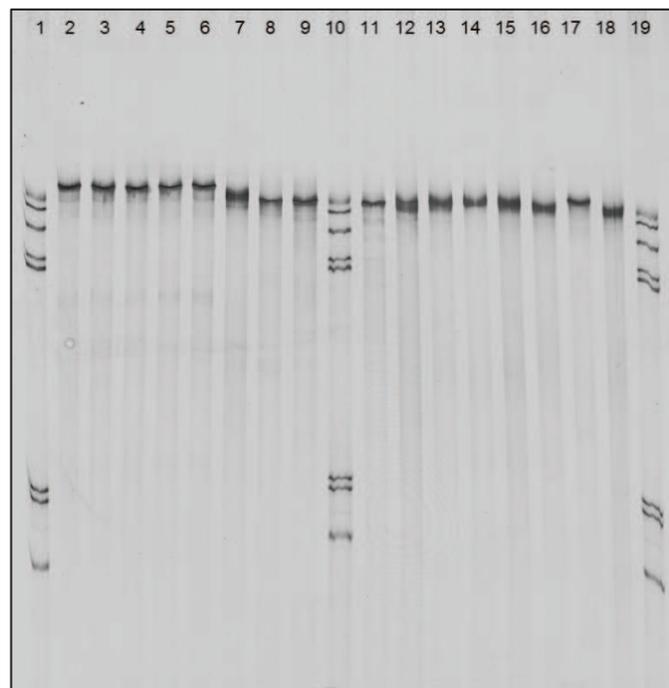


Abbildung 21: Wiederholung der PCR-SSCP-Analyse ausgewählter Banden der Gelposition 621/627 mit veränderten Trennbedingungen gegenüber dem Standardverfahren (MDE-Konzentration: 35 %; Laufzeit: 32 h)

Auftragsreihenfolge (Probenbezeichnung anhand Tabelle 34; Ergebnis der Sanger-Sequenzierung in Klammern):

1: Speziesstandard; 2: Probe 1 (*Exophiala* sp.); 3: Probe 2 (*Exophiala* sp.); 4: Probe 3 (*Exophiala* sp.); 5: Probe 4 (*Exophiala* sp.); 6: Probe 5 (*Exophiala* sp.); 7: Probe 6 (*Exophiala* sp.); 8: Probe 7 (*Glyphium elatum*); 9: Probe 8 (*Glyphium elatum*); 10: Speziesstandard; 11: Probe 14 (*Phialophora europaea*); 12: Probe 13 (*Aureobasidium pullulans*); 13: Probe 9 (*Penicillium commune*); 14: Probe 10 (*P. lanosum/nalgiovense*); 15: Probe 11 (*P. lanosum/nalgiovense*); 16: Probe 12 (*P. lanosum/nalgiovense*); 17: Probe 15 (unkultivierter Pilz); 18: Probe 16: (nicht editierbar); 19: Speziesstandard

(2) Im zweiten Schritt wurden, für eine genauere Bestimmung der zu Asthma invers assoziierten Pilzgenera *Exophiala* spp. und *Penicillium* spp. (Gelposition 621/627) auf Speziesebene, PCR-Amplifikationsversuche mit vier speziesspezifischen Primerpaaren (Tabelle 17) durchgeführt. Als Template wurden die sechzehn Crush & Soak-Proben der Gelposition 621/627 und die jeweiligen primären PCR-Amplifikate nach Gelextraktion (570-590 bp Fragment) verwendet. Das *Exophiala jeanselmei*-spezifische Primerpaar E1m/E2 hatte als einziges der vier Primerpaare nicht die ITS-Region, sondern das mitochondriale Cytochrom b als Zielregion. Da aufgrund dessen eine Amplifikation sowohl der Crush & Soak- als auch der PCR-Amplifikate nicht möglich war, wurde zum Nachweis von *Ex. jeanselmei* in der Ausgangsprobe zudem das native DNA-Totalextrakt der entsprechenden Staubproben eingesetzt. Tabelle 35 fasst die Ergebnisse zusammen. Die Agarosegelbilder sind in Anhang B4 dargestellt.

Nach Amplifikation der Proben mit den genannten Primerpaaren war eine spezifischere Aussage nicht möglich. *Exophiala jeanselmei*-DNA konnte in allen nativen DNA-Extrakten nachgewiesen werden. Ein Vorhandensein in den ausgeschnittenen Gelbanden war aufgrund der abweichenden Zielregion des Primerpaares E1m/E2 nicht bestimmbar. In acht von sechzehn Proben konnte bei Verwendung des ITS1/ITS4-Fragments ein Fragment mit der erwarteten Größe von *Ex. dermatitidis* amplifiziert werden, jedoch war bei allen C&S-Proben aus der PCR-SSCP-Analyse keine Amplifikation ersichtlich. Zudem zeigte sich bei Einsatz der nativen DNA-Extrakte nur bei Probe 1 ein Fragment mit entsprechender Länge von 455 bp, während in allen anderen Proben ein Fragment von über 1000 bp Länge detektiert werden konnte (Anhang B4).

Tabelle 35: Amplifikation von Proben der Gelposition 621/627 mit speziesspezifischen Primerpaaren von *Exophiala* spp. und *Penicillium* spp.

Template	C&S-Probe			ITS1/ITS4-Fragment			natives DNA-Extrakt			
Primer	PchryF4-1 / PchryR8	PchryF1 / PauraR1	ExdF / ExdR	PchryF4-1 / PchryR8	PchryF1 / PauraR1	ExdF / ExdR	P ^a chryF4-1 / PchryR8	P ^b chryF1 / PauraR1	E1m / E2	ExdF / ExdR
Probe										
1	+	-	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	+
2	+	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
3	+	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
4	+	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
5	+	-	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	-
6	-	+	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	-
7	-	+	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
8	+	-	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	-
9	+	+	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	-
10	+	+	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	-
11	+	+	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	-
12	+	+	-	+	+	-	n.d.	n.d.	+	-
13	+	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
14	+	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
15	-	-	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
16	-	+	-	+	+	+	n.d.	n.d.	+	-
DSM 844	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	n.d.	n.d.

Für Probenindex s. Tabelle 34; C&S: Crush & Soak; DSM 844: *Penicillium chrysogenum*;

n.d.: nicht durchgeführt → a,b: nicht durchgeführt, da Proben positiv bei Analyse des ITS1/ITS4-Fragments (570-590 bp)

Zielregionen der Primerpaare:

PchryF4-1/PchryR8: 70 bp-Fragment der ITS-Region von *Penicillium chrysogenum*

PchryF1/PauraR1: 121 bp-Fragment der ITS-Region von *P. crustosum/camembertiil/commune/echinulatum/solitum*

E1m/E2: 402 bp-Fragment des mitochondrialen Cytochrom b Gens von *Exophiala jeanselmei*

ExdF/ExdR: 455 bp-Fragment der ITS-Region von *Exophiala dermatitidis*

Auch ein Abgleich der Sanger-Sequenz von Probe 2 (*Exophiala* sp.; EU035420.1) mit zufällig gewählten Referenzsequenzen in der NCBI-BLAST Datenbank von *Ex. dermatitidis*, *Ex. jeanselmei*, *Ex. spinifera* und *Ex. oligosperma* ließ keine speziesbezogenere Aussage zu (Tabelle 36). Im Vergleich mit den Referenzsequenzen von *Ex. dermatitidis* (JX669013.1; JN391329.1) zeigten sich zudem jeweils zwei, zum Teil sehr kurze, Fragmentabschnitte, die in den Vergleich mit eingingen, während bei den anderen *Exophiala* spp. jeweils nur ein Abschnitt mit der Sequenz von Probe 2 verglichen wurde. Alle vier *Exophiala* spp. zeigten bezüglich der Hauptsequenzlänge vergleichbare Ähnlichkeiten zu der Sequenz von Probe 2 (Tabelle 36).

Tabelle 36: Vergleich der Sanger-Sequenz von Probe 2 der Gelposition 621/627 (*Exophiala* sp.; EU035420.1) mit Datenbank-Referenzsequenzen (NCBI-BLAST) von vier *Exophiala* spp.

Referenzsequenz	GenBank Nr.	Länge [bp]	Übereinstimmung / Länge der Vergleichssequenz
<i>Exophiala</i> sp. (Probe 2)	EU035240.1	612	-
<i>Ex. dermatitidis</i>	JX669013.1	792	93 % / 197 nt // 97 % / 67 nt
<i>Ex. dermatitidis</i>	JN391329.1	634	81 % / 423 nt // 98 % / 55 nt
<i>Ex. jeanselmei</i> CBS 677.76	JN625228.1	586	77 % / 609 nt
<i>Ex. jeanselmei</i>	JN473276.1	588	78 % / 607 nt
<i>Ex. spinifera</i> CBS 101644	JN625229.1	550	82 % / 410 nt
<i>Ex. spinifera</i>	HQ011928.1	650	80 % / 637 nt
<i>Ex. oligosperma</i> CBS 658.76	JN625230.1	546	82 % / 379 nt
<i>Ex. oligosperma</i>	DQ836797.1	655	79 % / 643 nt

nt: Nukleotide

Die Amplifikation des ITS1/ITS4-Fragments mit den *Penicillium*-spezifischen Primerpaaren PchryF4-1/PchryR8 und PchryF1/PauraR1 war in allen Fällen erfolgreich (Tabelle 35). *Penicillium*-DNA war somit in allen Proben vorhanden. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Amplifikation der Crush & Soak-Proben zeigte sich, dass 12 von 16 Proben (621/627–1-4 und –8-14) positiv bezüglich des Vorhandenseins von *P. chrysogenum* waren. Darunter fielen auch die vier Proben (621/627–9-12), die bei der Sanger-Sequenzierung der gewählten Polyacrylamidgelbanden *Penicillium* spp. ergaben. Amplifiziert wurden zudem sieben der sechzehn Proben mit Primerpaar

PchryF1/ PauraR1, davon ebenfalls die Proben 621/627–9-12 (Tabelle 35). Die zusätzliche Amplifikation von *Penicillium*-spezifischen Fragmenten in weiteren Proben, abgesehen von den Proben 621/627–9-12, schien die durch die Firma SEQUIERVE GmbH geäußerte Aussage hinsichtlich der Sequenzheterogenität der einzelnen Gelbanden zu bestätigen. Zum Nachweis, dass es sich bei den erhaltenen Ergebnissen tatsächlich um *Penicillium*-spezifische DNA handelte, wurde die DNA aus den Agarosegelbanden der Proben 621/627–1-3 und 621/627–8 aus der Amplifikation mit Primerpaar PchryF4-1/PchryR8 sowie der Proben 621/627–7 und 621/627–9 aus der Amplifikation mit Primerpaar PchryF1/PauraR1 mittels Gelextraktion aus dem Gel isoliert und ebenfalls durch Sanger-Sequenzierung analysiert. In allen sechs Fällen konnten die entsprechenden Spezies eindeutig bestätigt werden: 100 % Übereinstimmung mit *P. chrysogenum* (EU869181.1; Proben 621/627–1-3 und 621/627–8) und 98 % Übereinstimmung mit *P. commune* (JX171184.1; Proben 621/627–7 und 621/627–9).

Durch die Untersuchung der Proben mit den speziesspezifischen Primerpaaren konnte zudem eine Verknüpfung zu der zusätzlichen PCR-SSCP-Analyse der zuvor ausgewählten Banden der Gelposition 621/627 (Abbildung 21) hergestellt werden. Die Hauptsequenz der Gelbande von Probe 621/627–14 wurde eindeutig als *Au. pullulans* bestimmt (Tabelle 34). Bei der PCR-SSCP-Analyse der Gelbande unter modifizierten Bedingungen war eine Doppelbande im Polyacrylamidgel erkennbar, wovon eine Bande auf Höhe des Speziesstandards *P. chrysogenum* lokalisiert werden konnte. Darüber hinaus konnte *P. chrysogenum*-DNA mittels dem Primerpaar PchryF4-1/PchryR8 in dieser Probe nachgewiesen werden (Tabelle 35). Zusätzlich wurde in Probe 621/627–16 *Penicillium*-DNA mittels Primerpaar PchryF1/PauraR1 gefunden, was die oben genannte Vermutung aufgrund der Lage der Bande im Polyacrylamidgel bestätigt, nachdem zuvor keine Hauptsequenz in dieser Probe editiert werden konnte.

4.3.1.3.2 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach Bandmatching-Analyse der Bandeninformationen

Bei Kontrolle der durch die Software GelCompar[®] II automatisch anhand der Bandeninformationen erstellten Bandenklassen, wurden teilweise Fehlklassifikationen einzelner Banden zu der darüber- oder darunterliegenden Bandenklasse festgestellt. Deshalb wurden für alle vier signifikanten Gelpositionen jeweils drei Banden von drei unterschiedlichen Gelen ausgewählt, die exakt die respektive Bandenklasse repräsentierten. Die Bandenklasse 34,7 % („Asthma-protektiv“) war hierbei mit der relativen Laufweite von Speziessstandard *Aureobasidium pullulans* (DSM 1943) sowie die Bandenklasse 77,2 % („Asthma-protektiv“) mit der relativen Laufweite von Speziessstandard *Wallemia sebi* (DSM 5329) assoziiert. Vier Proben waren aufgrund der Sequenzzusammensetzung für die Editierung einer Hauptsequenz zu heterogen. Aus diesem Grund konnten für die Bandenklasse 42,9 % nur eine Probe sowie für die Bandenklassen 34,7 % und 77,2 % nur zwei Proben ausgewertet werden. Die Ergebnisse des Datenbankenabgleichs der erhaltenen Hauptsequenzen je Probe sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach Auswertung der Bandenklassen der Bandmatching-Analyse

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]
34,7 %	1	<i>Rumex acetosa voucher</i> (AF189730.1)	99	90
	2	unkultivierter Pilz (FJ820755.1)	100	96
	3	nicht editierbar	---	---
42,9 %	1	<i>Septoria dysentericae</i> (GU214699.1)	100	99
		<i>Septoria convolvuli</i> (GU214697.1)	100	99
		<i>Septoria lycopersici</i> (CBS 354.49)	98	100
	2	nicht editierbar	---	---
	3	nicht editierbar	---	---

Fortsetzung Tabelle 37: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung nach Auswertung der Bandenklassen der Bandmatching-Analyse

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]
53,0 %	1	<i>Sydowia polyspora</i> (GQ412728.1)	100	98
	2	<i>Sydowia polyspora</i> (GQ412728.1)	100	99
	3	nicht editierbar	---	---
77,2 %	1	<i>Wallemia muriae</i> (DTO 079-G3)	100	100
	2	<i>Wallemia muriae</i> (DTO 089-G5)	97	96
	3	<i>Botryotinia fuckeliana</i> (HM849615.1)	100	99

Inverse Assoziationen sind fett gedruckt. GenBank Nummern in Klammern.

Die Sanger-Sequenzierung bestätigte die Assoziation der Bandenklasse 77,2 % mit der Laufweite des Speziesstandards *Wallemia sebi* (DSM 5329); in zwei von drei Fällen ergaben die Informationen der Datenbanken *W. muriae* als wahrscheinlichsten Treffer. Der Vergleich der Sequenzen zeigte eine Übereinstimmung von 97 %. Darüber hinaus konnte bei dieser Gelposition *Botryotinia fuckeliana* als möglicherweise invers assoziiert mit allergischem Asthma gefunden werden. Bei der zu Asthma positiv assoziierten Bandenklasse 53,0 % konnte *Sydowia polyspora* (Nadelpilz des Kieferbaumes) eindeutig bestimmt werden. Auf der anderen Seite war eine definitive Aussage bezüglich des Genus bzw. der Spezies für die invers assoziierten Bandenklassen 34,7 % und 42,9 % nicht möglich. Bei ersterer wurde als einziger Fall in der vorliegenden Studie, mit *Rumex acetosa voucher* (Sauerampfer) pflanzliche DNA als Hauptsequenz ermittelt; bei der zweiten auswertbaren Probe wurde eine Sequenz eines bisher nicht-kultivierten Pilzes gefunden. Verschiedene *Septoria* spp. könnten bei Bandenklasse 42,9 % für einen möglicherweise Asthma-protectiven Effekt verantwortlich sein, allerdings lediglich basierend auf der Sequenzierung einer Einzelprobe.

4.3.1.3.3 Ergebnisse der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (Tabelle 34 und Tabelle 37) wurden 32 der 37 Einzelproben für die Parallelsequenzierung ausgewählt und als Gemisch eingesetzt. Hierbei wurden die Hauptsequenz, analog zur Sanger-Sequenzierung, und die Sequenzdiversität je Probenbande bestimmt. Fünf Proben wurden aufgrund nicht ausreichender DNA-Konzentration nach Reamplifikation der DNA-Isolate aus dem Polyacrylamidgel ausgeschlossen. Dabei handelte es sich um folgende Proben (Gelposition-Probennummer): 1132-4, 1410-3, 53,0 %-3, 77,2 %-2 und 77,2 %-3.

Insgesamt wurden 96.784 hochqualitative Sequenzen erzeugt. Im Mittel lag die Sequenzanzahl je Probe bei 3018,5 Sequenzen mit einem Minimum von 231 (Probe 621/627-7) und einem Maximum von 13.301 (Probe 1132-2). Die mittlere Sequenzlänge lag bei 524,82 Nukleotiden. Die Analyse mittels QIIME und UCLUST ergab 4787 repräsentative OTU-Sequenzen, wovon 634 aufgrund zu geringer Häufigkeit über die Probengesamtheit (< 5) nicht in die weitere Auswertung übernommen wurden. Der Datenbankenabgleich wurde bis zu einer Häufigkeit einer OTU-Sequenz von ≥ 10 durchgeführt.

Zwei OTU-Sequenzen waren in nahezu allen Proben vorhanden und zeigten demnach keine Probenspezifität. Hierbei handelte es sich um die OTU-Sequenz 1603 (*Epicoccum nigrum*; 100 %; JQ619839.1), welche in 27 von 32 Proben und dabei in 17 Fällen mit einer Häufigkeit von über 10, sowie um die OTU-Sequenz 693 (*Aureobasidium pullulans*; 100 %; JX462673.1), welche in 26 von 32 Proben und dabei in 16 Fällen mit einer Häufigkeit von über 10 – hauptsächlich bei den invers assoziierten Gelpositionen 621/627 und 34,7 % – nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte u.a. auch OTU-Sequenz 1416 (*Pseudotaeniolina globosa*; HQ115663.1) keiner Probengruppe zugeordnet werden.

Hinsichtlich der Hauptsequenz stimmten die Ergebnisse von Sanger-Sequenzierung und Parallelsequenzierung in 21 von 28 Fällen überein. Bei denjenigen Proben, bei denen sich die Hauptsequenzen unterschieden, waren aber in allen Fällen Sequenzen der jeweiligen Pilzspezies mit geringerer Häufigkeit vertreten. Die Einzelergebnisse für jede Probe sind in Tabelle 38 noch einmal übersichtlich dargestellt. Alle

Proben zeigten dabei eine Diversität an Sequenzen verschiedenster Pilzspezies. Durch die Parallelsequenzierung war zudem nun eine Aussage bezüglich der zuvor nicht editierbaren Proben möglich. Dadurch konnte bestätigt werden, dass bei den Proben 621/627–15 und –16 (s.a. Abbildung 21) eine Zuordnung zu *Exophiala* sp. und *Penicillium* spp. aufgrund der Lage der Banden im Polyacrylamidgel korrekt war (s. Punkt 4.3.1.3.1). Darüber hinaus bestätigte sich, wie in Punkt 4.3.1.3.1 bereits postuliert, dass die Gelpositionen 621/627 zusammen betrachtet werden mussten, da auch in anderen Proben, neben 621/627–1-6, Sequenzen von *Exophiala* sp. zu finden waren. Zusätzlich wurde in der Probe 34,7 %-1 unter den dominanten Sequenzen nun keine pflanzliche DNA mehr gefunden. Allerdings wurden in 2 von 3 Proben der Gelposition 34,7 % Sequenzen von *Au. pullulans* nachgewiesen, sodass die Lage dieser Bandenklasse auf der Laufweite des Speziesstandards *Au. pullulans* (DSM 2404), wie unter Punkt 4.3.1.3.2 bereits erwähnt, bestätigt werden konnte.

Zusammenfassend können folgende Pilzspezies als signifikant invers assoziiert mit Asthma (Asthma-protektiv) angesehen werden:

- *Exophiala* sp.,
- verschiedene *Penicillium* spp. (*P. commune*, *P. lanosum*, *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. spinulosum*),
- *Aureobasidium pullulans*,
- *Glyphium elatum*,
- *Phialophora europaea* (alle von Gelposition 621/627),
- *Leptosphaerulina chartarum* (Gelposition 34,7 %),
- *Septoria lycopersici* (Gelposition 42,9 %) und
- *Wallemia muriae* (Gelposition 77,2 %).

Bei Gelposition 1132 war keine definitive Aussage möglich.

Auf der anderen Seite waren mögliche Kandidaten für eine positive Assoziation mit Asthma:

- *Didymella exitialis*,
- *Saccharicola bicolor*,
- *Pseudotaeniolina globosa* (alle von Gelposition 1410) und
- *Sydowia polyspora* und/oder *Rhizosphaera kalkhoffii* (Gelposition 53,0 %).

Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden

Gel-position	Probe (Kind)	Hauptsequenz Sanger-Sequenzierung	Hauptsequenz Parallelsequenzierung	Sequenz-identität [%] (Parallelseq.)
621/627	1	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
		<i>weitere Vertreter:</i>	<i>Amandinea punctata</i> (EU681282.1)	99
			<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100
			unkultivierter Pilz (FJ820822.1)	97
	2	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
		<i>weitere Vertreter:</i>	<i>Rhinocladiella</i> sp. (FJ265763.1)	99
			<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100
			unkultivierter Pilz (FJ820822.1)	97
	3	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
		<i>weitere Vertreter:</i>	unkultivierter Pilz (FJ820822.1)	97
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
			<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100
	4	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
		<i>weitere Vertreter:</i>	<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
	5	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
		<i>weitere Vertreter:</i>	unkultivierter Pilz (FJ820822.1)	97
			<i>Pseudendoconiopsis botryoides</i> (FR865755.1)	97
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
	6	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
		<i>weitere Vertreter:</i>	<i>Amandinea punctate</i> (EU681282.1)	99
			<i>Penicillium commune</i> (JX171184.1)	99
7	<i>Glyphium elatum</i> (CBS268.34)	<i>Chaetodiplodia</i> sp. (CBS568.88)	96	
	<i>weitere Vertreter:</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100	
		<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99	

Fortsetzung Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden

Gel-position	Probe (Kind)	Hauptsequenz Sanger-Sequenzierung	Hauptsequenz Parallelsequenzierung	Sequenz-identität [%] (Parallelseq.)
621/627	7	<i>weitere Vertreter (Fortsetzung):</i>	<i>Glyphium elatum</i> (CBS268.34)	100
	8	<i>Glyphium elatum</i> (CBS268.34) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1) <i>Glyphium elatum</i> (CBS268.34)	100 100
	9	<i>Penicillium commune</i> (GQ458026.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Penicillium commune</i> (JX171184.1) unkultivierter Pilz (JF737796.1) <i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1) <i>Penicillium chrysogenum</i> (JQ861220.1)	99 96 100 96
	10	<i>Penicillium lanosum / nalgioense</i> (EU833224.1 / CBS352.48) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Penicillium spinulosum</i> (JX230995.1) <i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1) <i>Penicillium glabrum</i> (FJ491804.1) <i>Eurotium niveoglaucum</i> (HE578069.1) <i>Penicillium thomii</i> (JQ582447.1)	99 100 97 99 99
	11	<i>Penicillium lanosum / nalgioense</i> (EU833224.1 / CBS352.48) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1) <i>Penicillium brevicompactum</i> (AB479306.1) <i>Amandinea punctate</i> (EU681282.1) <i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1) <i>Leptosphaerulina chartarum</i> (GU566269.1) <i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	100 100 99 100 100 99
	12	<i>Penicillium lanosum / nalgioense</i> (EU833224.1 / CBS352.48) <i>weitere Vertreter:</i>	unkultivierter Pilz (EU516795.1) <i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1) <i>Myelochroa aurulenta</i> (HQ671303.1)	98 100 100

Fortsetzung Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden

Gel-position	Probe (Kind)	Hauptsequenz Sanger-Sequenzierung	Hauptsequenz Parallelsequenzierung	Sequenz-identität [%] (Parallelseq.)
621/627	12	<i>weitere Vertreter (Fortsetzung):</i>	<i>Penicillium spinulosum</i> (JX230995.1)	99
			<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
	13	Aureobasidium pullulans (HM849619.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Aureobasidium pullulans (AB693902.1)</i>	100
			<i>Chaetodiplodia</i> sp. (CBS568.88)	96
			<i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> (GQ891871.1)	99
			<i>Penicillium spinulosum</i> (JX230995.1)	99
			<i>Bacidina adastr</i> a (JN972442.1)	99
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
			<i>Penicillium brevicompactum</i> (AB479306.1)	100
	14	<i>Phialophora europaea (EF540756.1)</i> <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Phialophora europaea (AB456578.1)</i>	99
			<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
	15	unkultivierter Pilz (HM164580.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Pseudotaeniolina globosa</i> (HQ115663.1)	99
			unkultivierter Pilz (HM164580.1)	95
			<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99
			<i>Rhinochlaadiella</i> sp. (FJ265766.1)	97
	16	nicht editierbar <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100
			<i>Penicillium brevicompactum</i>	100
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
			<i>Myelochroa aurulenta</i> (HQ671303.1)	100
			<i>Exophiala</i> sp. (EU035420.1)	99

Fortsetzung Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden

Gel-position	Probe (Kind)	Hauptsequenz Sanger-Sequenzierung	Hauptsequenz Parallelsequenzierung	Sequenz-identität [%] (Parallelseq.)
621/627	16	<i>weitere Vertreter (Fortsetzung):</i>	<i>Eurotium niveoglaucum</i> (HE578069.1)	99
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
			<i>Penicillium spinulosum</i> (JX230995.1)	99
1132	1	unkultivierte <i>Pleosporales</i> sp. (GU909871.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Monodictys castenae</i> (CBS102.60)	93
			<i>Cryptococcus paraflavus</i> (AY395800.1)	99
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
	2	unkultivierter Pilz (EU852358.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Eurotium niveoglaucum</i> (HE578069.1)	99
			<i>Chaetopyrena penicillata</i> (JQ663990.1)	100
			unkultivierter Pilz (EU852358.1)	98
3	unkultivierter Pilz (EU718669.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100	
		<i>Sporobolomyces lactosus</i> (AB038132.1)	99	
1410	1	<i>Saccharicola bicolor</i> (AF455415.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Saccharicola bicolor</i> (AF455415.1)	99
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
			<i>Pseudotaeniolina globosa</i> (HQ115663.1)	99
	2	<i>Ascomycota</i> sp. (HQ607922.1) <i>weitere Vertreter:</i>	<i>Ascomycota</i> sp. (HQ607922.1)	99
			<i>Didymella exitialis</i> (EU167564.1)	100
			<i>Pichia fermentans</i> (Q458040.1)	98
		<i>Pseudotaeniolina globosa</i> (HQ115663.1)	99	
		<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100	

Fortsetzung Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden

Gel-position	Probe (Kind)	Hauptsequenz Sanger-Sequenzierung	Hauptsequenz Parallelsequenzierung	Sequenz-identität [%] (Parallelseq.)
1410	4	<i>Didymella exitialis</i> (EU167564.1)	<i>Didymella exitialis</i> (EU167564.1)	100
		weitere Vertreter:	<i>Pichia fermentans</i> (Q458040.1)	98
	5	Unkultivierte Ascomycota sp. (EU520640.1)	<i>Lichinella iodopulchra</i> (DQ842016.1)	81
		weitere Vertreter:	<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
			<i>Didymella exitialis</i> (EU167564.1)	100
			<i>Phoma herbarum</i> (AY293800.1)	99
			<i>Pseudotaeniolina globosa</i> (HQ115663.1)	99
34,7 %	1	<i>Rumex acetosa voucher</i> (AF189730.1)	<i>Leptosphaerulina chartarum</i> (GU566269.1)	100
		weitere Vertreter:	<i>Phaeococcomyces nigricans</i> (AY843154.1)	98
	2	unkultivierter Pilz (FJ820755.1)	unkultivierte Ascomycota sp. (FR682219.1)	99
		weitere Vertreter:	<i>Leptosphaerulina chartarum</i> (EU272493.1)	100
			<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100
			<i>Lecania naegelii</i> (FR799198.1)	99
			<i>Acarospora moenium voucher Nordin</i> (FJ815428.1)	98
			<i>Phaeococcomyces nigricans</i> (AY843154.1)	98
			<i>Venturia pyrina</i> (EU035468.1)	99
	3	nicht editierbar	<i>Chaetodiplodia</i> sp. (CBS568.88)	96
		weitere Vertreter:	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AB693902.1)	100
			<i>Phaeococcomyces nigricans</i> (AY843154.1)	97
42,9 %	1	<i>Septoria dysentericae</i> (GU214699.1)	<i>Septoria lycopersici</i> (DQ841156.1)	99
		<i>Septoria convolvuli</i> (GU214697.1)		
		<i>Septoria lycopersici</i> (CBS354.49)		

Fortsetzung Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden

Gel-position	Probe (Kind)	Hauptsequenz Sanger-Sequenzierung	Hauptsequenz Parallelsequenzierung	Sequenz-identität [%] (Parallelseq.)	
42,9 %	1	<i>weitere Vertreter:</i>	unkultivierter Pilz (FJ820761.1)	97	
			<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100	
	2	nicht editierbar	<i>weitere Vertreter:</i>	unkultivierter Ascomycota Klon (EU520640.1)	97
				<i>Eurotium herbariorum</i> (GU319986.1)	99
				<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
				<i>Sporobolomyces lactosus</i> (AB038132.1)	99
	3	nicht editierbar	<i>weitere Vertreter:</i>	<i>Candida albicans</i> (JN606308.1)	99
				unkultivierte Ascomycota sp. (FR682370.1)	99
				<i>Capnodium</i> sp. (AY805548.1)	100
				<i>Phaeocryptopus gaeumannii</i> (JN408842.1)	99
				<i>Cercospora centaureicola</i> (EU019257.1)	98
				<i>Phaeophyscia endophoenicea</i> (AF224445.1)	99
				<i>Coniothyrium carteri</i> (JF740180.1)	100
				<i>Rhodotorula pinicola</i> (AF444292.1)	99
				<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
53,0 %	1	Sydowia polyspora (GQ412728.1)	<i>weitere Vertreter:</i>	<i>Septoria lycopersici</i> (DQ841156.1)	99
				<i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
				<i>Sydowia polyspora</i> (EU877261.1)	99
				<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> (EU700376.1)	100
				<i>Drechslera andersenii</i> (AY004805.1)	92
			<i>Phoma macrostoma</i> (DQ474069.1)	99	

Fortsetzung Tabelle 38: Vergleich der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung (nach densitometrischer und Bandmatching-Auswertung der PCR-SSCP-Daten) und der Parallelsequenzierung ausgewählter Banden

Gel-position	Probe (Kind)	Hauptsequenz Sanger-Sequenzierung	Hauptsequenz Parallelsequenzierung	Sequenz-identität [%] (Parallelseq.)
53,0 %	2	Sydowia polyspora (GQ412728.1)	Sydowia polyspora (EU877261.1)	99
			<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i> (EU700376.1)	100
			<i>weitere Vertreter:</i> <i>Epicoccum nigrum</i> (JQ619839.1)	100
			<i>Phoma macrostoma</i> (DQ474069.1)	99
77,2 %	1	Wallemia muriae (DTO 079-G3)	Wallemia muriae (DTO 079-G3)	100
			<i>weitere Vertreter:</i> <i>Cryptococcus</i> sp. (HQ875392.1)	99
			<i>Cryptococcus victoriae</i> (AM160647.1)	99

Invers assoziierte Gelpositionen und Hauptsequenzen je Probe fett gedruckt

4.3.2 Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben (GABRIEL) – Pilotversuch

In diesem Pilotversuch wurden 60 Matratzenstaubproben der GABRIEL-Studie, die zuvor bereits mit Hilfe der PCR-SSCP-Analyse untersucht wurden, in die Parallelsequenzierung eingesetzt. Analog zur PCR-SSCP-Analyse wurde auch hier das isolierte 570-590 bp Fragment der Agarosegelelektrophorese aus der initialen PCR verwendet. 15 Proben stammten jeweils von einer der vier Hauptgruppen (4x15 = 60 Proben) – asthmatische Bauern, nicht-asthmatische Bauern, asthmatische Nichtbauern und nicht-asthmatische Nichtbauern (s.a. Abbildung 5). Ermittelt wurde die Diversität an Pilzspezies je Probengruppe sowie mögliche Assoziationen bestimmter Sequenzen zu allergischem Asthma. Die Parallelsequenzierung wurde in drei Durchgängen á 20 Proben, je fünf von jeder Gruppe, durchgeführt und die erhaltenen Sequenzen für die weitere Auswertung mittels UCLUST in QIIME zusammengefasst. Die drei Durchgänge untereinander waren vergleichbar. Insgesamt wurden 152.605 ITS-Sequenzen, ca. 50.000 je Durchgang, erzeugt. Die durchschnittliche Sequenzlänge lag bei 478 Nukleotiden. Die Anzahl an Sequenzen variierte je Probe von 325 bis 17526 und lag im Mittel bei 2536,6. Die Gruppierung mittels UCLUST bei Sequenzübereinstimmung von mindestens 97 % ergab 7954 OTU-Sequenzen mit einer Sequenzverteilung von 122 bis 12466 pro Probe im Gesamten und 2692 repräsentative OTU-Sequenzen (nosingletons).

Für die Diversitätsanalyse der einzelnen Probengruppen wurde die Anzahl an OTU-Sequenzen auf eine Häufigkeit von > 10 bzw. > 50 eingeschränkt, sodass 428 bzw. 108 repräsentative OTU-Sequenzen ausgewertet wurden. Je Probe wurde der Datenbankabgleich bis zu einer respektiven OTU-Häufigkeit von ≥ 10 durchgeführt. Zwischen den beiden genannten Einschränkungen der OTU-Auswertung wurden keine relevanten Unterschiede festgestellt. Durch die stärkere Einschränkung (> 50) wurden in der Regel lediglich OTU-Sequenzen ausgeschlossen, welche spezifisch für eine Einzelprobe jedoch nicht für die Gesamtheit der Proben waren. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich daher auf die 108 häufigsten OTU-Sequenzen; die relativen Häufigkeiten wurden in Bezug auf die 2692 OTU-Sequenzen (nosingletons) bestimmt. Zum Teil wurden Pilzspezies durch mehrere OTU-Sequenzen repräsentiert, wenn die Sequenzübereinstimmung bei maximal 96,99 % lag. Für die Auswertung wurden hier allerdings lediglich die häufigsten OTUs herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 zusammengefasst. Die häufigste Sequenz

(OTU 6175) ergab beim Datenbankabgleich eindeutig *Epicoccum nigrum*. Insgesamt repräsentierte diese OTU 30,89 % aller Sequenzen und variierte bezüglich der Häufigkeit zwischen den Gruppen von 26,85 % bis 37,20 %, war jedoch etwas häufiger mit Proben aus der Gruppe der Nichtbauern assoziiert. 6,57 % der Sequenzen gehörten zu *Cryptococcus victoriae* (OTU 7678 und 7930), 4,96 % zu *Eurotium repens* (OTU 3639), 3,80 % zu *Leptosphaerulina chartarum* (OTU 5373 und 7107), 3,00 % zu *Cladosporium cladosporioides* (OTU 2662 und 3535), 3,27 % zu *Pichia fermentans* (OTU 3233), 2,63 % zu *Aureobasidium pullulans* (OTU 100), 2,53 % zu *Debaryomyces hansenii* (OTU 5433) und 2,35 % zu *Didymella exitialis* (OTU 5905). Des Weiteren waren *Phoma herbarum* (1,08 %; OTU 2415) und *Pseudotaeniolina globosa* (1,06 %; OTU 1353) häufig vertreten. *Penicillium*- und *Aspergillus*-Sequenzen, bei letzterem mit Ausnahme von *Eurotium* spp., wurden unter den dominanten Genera nicht gefunden. Ein Abgleich der ITS-Sequenzen der bereits zuvor verwendeten DSMZ-Referenzstämme von *P. chrysogenum* (DSM 844) und *A. versicolor* (DSM 1943) mit den repräsentativen OTU-Sequenzen der Spezies aus Tabelle 39 ergab keine signifikanten Übereinstimmungen. Im Vergleich der Häufigkeiten der einzelnen OTU-Sequenzen in Bezug auf die vier Probengruppen zeigte sich, dass *Ps. globosa* keine Gruppenzugehörigkeit erkennen ließ (Tabelle 39). *Leptosphaerulina* spp., *Alternaria alternata* und *Au. pullulans* waren häufiger bei den Nichtbauern, *Cl. cladosporioides*, *Eu. repens*, *Pi. fermentans*, *Trichosporon cutaneum* und *Wallemia sebi* häufiger bei den Bauern zu finden. Asthmatiker schienen einer höheren Exposition mit *Cr. victoriae* (alle Asthmatiker), *Ph. herbarum* (asthmatische Nichtbauern), *Cl. cladosporioides* und *D. exitialis* (asthmatische Bauern) ausgesetzt gewesen zu sein, während *Eu. amstelodami*, *Exophiala* sp., *Ph. medicaginis*, *T. cutaneum* und *Candida catenulata* am häufigsten bei den nicht-asthmatischen Bauern gefunden werden konnten. Dennoch wurde *Cr. victoriae* auch häufig bei den Nicht-Asthmatikern nachgewiesen. Das dominante Auffinden von *Exophiala* sp. bei den „gesunden“ sowie von *D. exitialis* bei den „kranken“ Bauern bestätigte zudem das Ergebnis der PCR-SSCP-Analyse.

Tabelle 39: Ergebnisse der Untersuchung der Pilzdiversität in Matratzenstaubproben von Schulkindern mittels Parallelsequenzierung

Pilzspezies	OTU	Relative Häufigkeit [%] der dominanten OTU-Sequenzen (nach Einschränkung auf die 108 häufigsten)				
		Gesamt	Bauer (a)	Bauer (na)	Nichtbauer (a)	Nichtbauer (na)
<i>Alternaria alternata</i>	1507	0,48	0,30	0,35	0,79	0,61
<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	2,63	1,29	0,66	3,83	5,64
<i>Boeremia diversispora</i>	2088	0,34	0,24	0,24	0,42	0,51
<i>Botryosphaeria australis</i>	7671	0,21	0,01	0,57	0,44	0,12
<i>Candida catenulata</i>	2092	0,09	0,10	0,18	0,00	0,12
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2662/ 3535	3,00	4,67	2,00	1,73	1,27
<i>Cryptococcus carnescens</i>	6965	0,66	0,39	0,54	1,13	0,76
<i>Cryptococcus victoriae</i>	7678/ 7930	6,57	8,81	3,87	5,56	4,17
<i>Debaromyces hansenii</i>	5433	2,53	2,43	3,38	2,35	2,48
<i>Didymella exitialis</i>	5905	2,35	4,87	0,43	0,37	0,09
<i>Didymella pisi</i>	1559	0,30	0,21	0,39	0,42	0,31
<i>Epicoccum nigrum</i>	6175	30,89	26,85	28,40	37,20	33,95
<i>Eurotium amstelodami</i>	524	0,41	0,43	1,57	0,08	0,00
<i>Eurotium repens</i>	3639	4,96	7,10	12,06	0,99	0,24
<i>Exophiala</i> sp.	1312	0,04	0,02	0,17	0,02	0,05
<i>Galactomyces geotrichum</i>	6395	0,07	0,07	0,01	0,00	0,18
<i>Leptosphaerulina australis</i>	7107	2,75	1,49	1,23	5,06	3,74
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	5373	1,05	0,63	0,65	1,52	1,73
<i>Phaeothecoidea protea</i>	7928	0,11	0,01	0,01	0,36	0,09
<i>Phoma herbarum</i>	2415	1,08	0,69	0,66	4,64	0,45
<i>Phoma medicaginis</i>	3996	0,27	0,26	0,96	0,11	0,04
<i>Pichia fermentans</i>	3233	3,27	6,11	4,27	0,03	0,02
<i>Pseudotaeniolina globosa</i>	1353	1,06	0,67	1,35	1,27	1,57
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2995	0,04	0,04	0,17	0,00	0,00
<i>Wallemia sebi</i>	6277	0,04	0,06	0,04	0,02	0,00

(a): mit diagnostiziertem Asthma; (na): ohne Asthmabefund (gesund)

Neben der Bestimmung der relativen Häufigkeiten der dominanten OTU-Sequenzen in Abhängigkeit der Probenherkunft und des Gesundheitsstatus der jeweiligen Kinder wurden, analog zur PCR-SSCP-Analyse, Assoziationen der einzelnen OTU-Sequenzen bezüglich des Auftretens von allergischem Asthma biostatistisch ermittelt. Hierfür wurden alle 2692 repräsentativen OTU-Sequenzen (nosingletons) herangezogen. 16 hoch-signifikante Sequenzen ($p < 0,01$) – 13 invers und drei positiv assoziiert – sowie 23 signifikante Sequenzen ($0,01 < p < 0,05$; alle invers assoziiert) wurden gefunden (Tabelle 40). 16 Sequenzen konnten nach dem Datenbankenabgleich hierbei am wahrscheinlichsten nur mit bisher nicht kultivierten Pilzen in Verbindung gebracht werden. Des Weiteren zeigten einige Sequenzen nach Datenbankenabgleich ungenügende Werte bezüglich der Vergleichslänge der Sequenz ($< 95\%$) sowie bezüglich der Sequenzübereinstimmung ($< 97\%$). Die Ergebnisse wurden als ausreichend beurteilt, sofern die Vergleichslänge bei über 95% und die Sequenzübereinstimmung bei über 97% gegenüber der eingegebenen Sequenz lag. Sequenzübereinstimmungen von 96% wurden als unsicher eingestuft.

Tabelle 40: Mit Asthma assoziierte, signifikante OTU-Sequenzen nach Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben unterschiedlicher Herkunft

OTU	OR	p	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]
p < 0,01					
4873	30,65	0,001	<i>Epicoccum nigrum</i> (JX402182.1)	100	98
			<i>Glonium pusillum</i> (EU552134.1)		
4866	7,47	0,009	<i>Verrucaria viridula</i> (EU553510.1)	98	92
1315	4,65	0,004	unkultivierter Pilz (GU721895.1)	87	93
1484	0,37	0,003	<i>Candelaria fibrosoides</i> (EF535211.1)	97	92
3996	0,35	0,001	unkultivierter Pilz (JQ723332.1)	70	99
2932	0,33	0,005	<i>Pseudotaeniolina globosa</i> (HQ115663.1)	73	97
5901	0,33	0,003	unkultivierter Pilz (GU721895.1)	100	98
593	0,30	0,003	unkultivierter Pilz (HQ873361.1)	66	98

Fortsetzung Tabelle 40: Mit Asthma assoziierte, signifikante OTU-Sequenzen nach Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben unterschiedlicher Herkunft

OTU	OR	p	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]
5197	0,25	0,005	unkultivierter Pilz (GU721713.1)	100	95
2892	0,23	0,006	unkultivierter Pilz (EU852358.1)	100	98
4127	0,23	0,002	<i>Bullera globispora</i> (FN824496.1)	100	100
			<i>Cryptococcus dimennae</i> (EU266559.1)	99	96
5329	0,16	0,003	<i>Cryptococcus laurentii</i> (CBS 2548)	100	97
			<i>Cryptococcus victoriae</i> (JQ857025.1)	99	98
4106	0,14	0,001	unkultivierter Pilz (GU721713.1)	100	96
1574	0,13	0,001	<i>Phoma macrostoma</i> (DQ474104.1)	100	99
760	0,11	0,006	<i>Aureobasidium pullulans</i> (DQ640766.1)	72	99
3844	0,02	0,006	<i>Epicoccum nigrum</i> (FJ424250.1)	100	92
0,01 < p < 0,05					
4472	0,46	0,035	<i>Botryotinia fuckeliana</i> (HM849615.1)	100	99
7107	0,45	0,018	<i>Leptosphaerulina australis</i> (JN712494.1)	100	99
1454	0,41	0,033	<i>Cryptococcus</i> sp. (FN430732.1)	100	100
7930	0,41	0,021	<i>Cryptococcus victoriae</i> (CBS 12044)	100	100
2415	0,40	0,023	<i>Phoma herbarum</i> (AY293800.1)	100	100
3945	0,38	0,019	unkultivierter Pilz (GU721895.1)	100	96
1925	0,35	0,020	<i>Epicoccum nigrum</i> (FJ605251.1)	100	96
6221	0,35	0,012	unkultivierter Ascomycota (AM901736.1)	99	98
6106	0,34	0,044	unkultivierter Bodenpilz (EU479959.1)	99	98
2763	0,34	0,040	unkultivierter Pilz (FJ820732.1)	100	99
2589	0,34	0,032	<i>Epicoccum nigrum</i> (FJ424259.1)	72	99

Fortsetzung Tabelle 40: Mit Asthma assoziierte, signifikante OTU-Sequenzen nach Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben unterschiedlicher Herkunft

OTU	OR	p	Sequenz	Übereinstimmung mit Länge [%]	Übereinstimmung mit Sequenz [%]
1529	0,31	0,026	<i>Cryptococcus victoriae</i> (FN298668.1)	100	98
4023	0,28	0,044	<i>Dioszegia fristingensis</i> (EU070927.1)	100	99
2000	0,21	0,014	unkultivierter Pilz (FJ820734.1)	99	99
1946	0,20	0,026	unkultivierter Pilz (FJ820764.1)	99	99
4699	0,19	0,015	<i>Aureobasidium pullulans</i> (JQ993367.1)	75	98
7360	0,18	0,025	unkultivierter Ascomycota (FR682345.1)	91	87
570	0,17	0,034	<i>Verrucaria elaeina</i> (FJ664849.1)	99	90
3981	0,11	0,034	unkultivierter Pilz (FJ820732.1)	100	96
985	0,09	0,019	unkultivierter Ascomycota (GU931768.1)	100	99
6395	0,09	0,018	<i>Galactomyces geotrichum</i> (JF262181.1)	100	99
3447	0,01	0,021	<i>Cryptococcus flavescens</i> (JQ993386.1)	100	99

Inverse Assoziationen fett gedruckt; Beurteilung als ausreichende Übereinstimmung mit Datenbankeneintrag; OTU: Operating Taxonomic Unit; OR: Odd's Ratio; p: Wahrscheinlichkeit

Eine Aussage über einen möglichen Kandidaten hinsichtlich einer Asthmainduktion konnte nicht getroffen werden. *E. nigrum* war nicht nur der häufigste Vertreter in allen vier Probengruppen bei dieser Diversitätsanalyse an sich (Tabelle 39), sondern zeigte sich sowohl signifikant positiv als auch invers assoziiert mit Asthma (Tabelle 40; OTU 4873 und 1925), was auch zuvor schon bei der PCR-SSCP-Analyse beobachtet wurde (Tabelle 38). Zudem ist die Übereinstimmung von 92 % von der OTU 4866 mit dem Datenbankeneintrag von *Verrucaria viridula* zu gering, um eine definitive Aussage zuzulassen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PCR-SSCP-Analyse wurden zwei Sequenzen (OTU 760 und 4699) als invers assoziiert deklariert, die nach Datenbankabgleich potenziell mit *Au. pullulans* assoziiert werden konnten (Tabelle 40). Diese weisen zwar jeweils eine ausreichende Übereinstimmung in der Sequenz auf. Allerdings lagen die Vergleichslängen bei lediglich 72 und 75 %. Die beiden OTU-

Sequenzen zeigten jedoch eine 97%ige (349 nt) bzw. 98%ige (370 nt) Übereinstimmung mit der stark vertretenen OTU 100 (*Au. pullulans*), die ebenfalls häufiger bei Nicht-Asthmatikern vertreten war, sowie eine jeweils 97%ige Übereinstimmung (356 bzw. 391 nt) mit der Sanger-Sequenz von *Au. pullulans* aus der PCR-SSCP-Analyse (Tabelle 34). Als weitere mögliche invers assoziierte Kandidaten konnten *Botryotinia fuckeliana*, *Bullera globispora*, verschiedene *Cryptococcus* spp. – *Cr. dimennae*, *Cr. flavescens*, *Cr. laurentii* und *Cr. victoriae* – , *Dioszegia fristingensis* und *Galactomyces geotrichum* identifiziert werden. *Bo. fuckeliana* und *Cryptococcus* spp. wurden bereits in Verbindung mit der Gelposition 77,2 % der PCR-SSCP-Analyse als invers assoziiert genannt (Tabelle 37 und Tabelle 38). *Ga. geotrichum* war zudem häufiger bei den Nicht-Asthmatikern bei dieser Diversitätsanalyse vertreten (Tabelle 39). *Bu. globispora* und *Di. fristingensis* traten bisher nicht auf und sind möglicherweise zusätzliche Kandidaten für einen inversen Effekt. Außerdem wurden in dieser Pilotstudie *Ph. herbarum* und *Ph. macrostoma* als möglicherweise Asthma- protektiv identifiziert.

5 Diskussion

5.1 Adaption der PCR-SSCP-Analysemethode und der Parallelsequenzierungstechnologie an die Untersuchung von Stall- und Hausstaubproben

5.1.1 DNA-Extraktionsverfahren

Drei DNA-Extraktionsverfahren wurden auf ihre Eignung zum Einsatz in dieser Untersuchung getestet: Methode 1: PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO), Methode 2: GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA) und Methode 3: CTAB-Verfahren nach KORTHALS ET AL. (2008A) mit Modifikationen. Methode 1 ist hierbei speziell für die Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften in Boden- respektive Staubproben ausgelegt und wurde neben der Isolation von bakterieller DNA auch schon für Pilz-DNA-Extraktionen angewendet (FEINSTEIN ET AL., 2009). Laut Herstellerangaben können hierbei bis zu 250 mg Erdreich eingesetzt werden und die vollständige Entfernung von Inhibitoren wie Huminsäuren soll gewährleistet sein. Wie der Name bereits aussagt, ist Methode 2 ursprünglich für die Isolation pflanzlicher DNA aus 100 mg frischem oder aus 10 mg gefriergetrocknetem Gewebe entwickelt worden, welches zu Beginn mit flüssigem Stickstoff pulverisiert wird. In mehreren Studien, u.a. des Nationalen Gesundheitsinstituts (Kuopio, Finnland), wurde dieser Kit aber auch für die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Hausstaubproben erfolgreich eingesetzt (PIETARINEN ET AL., 2008; PITKÄRANTA ET AL., 2008). Das ursprüngliche CTAB-Verfahren, auf dem die hier angewandte Methode aufbaute, wurde von SOMERVILLE ET AL. (2005) für die Isolation von *Mycobacterium tuberculosis* DNA entwickelt und später durch KORTHALS ET AL. (2008A) an die Untersuchung von Bakterien in Stall- und Matratzenstaubproben angepasst. Da in dieser Studie die gleiche Matrix wie bei KORTHALS ET AL. (2008A) verwendet wurde, wurde auch diese Methode für die Evaluierung eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens mit einbezogen. Aufgrund der aufwändigen und kostenintensiven Sammlung der Matratzenstaubproben im Rahmen der GABRIEL-Studie (GENUNEIT ET AL., 2011) und der daraus resultierenden „Kostbarkeit“ dieser Proben, wurde versucht, die benötigte Menge an Probenmaterial möglichst gering zu halten. 50 mg Staub je Extraktionsverfahren stellten sich hierbei als ausreichend und als Mittelweg bezüglich der bisherigen Studien mit den genannten Extraktionsverfahren dar: Methode 1 wurde durch FEINSTEIN ET AL. (2009)

mit 250 mg, Methode 2 durch PITKÄRANTA ET AL. (2008) mit 25 mg und das CTAB-Verfahren durch KORTHALS ET AL. (2008A) mit 100 mg Material durchgeführt. Bei allen drei Methoden wurde eine mechanische Destabilisierung der Pilzsporen mit Glass Beads vorangestellt, um die komplexe und robuste Zellwand der Sporen, die oft resistent gegenüber traditionellen DNA-Extraktionsprotokollen ist, aufzubrechen (VAN BURIK ET AL., 1997). Die Effizienz der Zelllyse kann zwischen verschiedenen Pilzzelltypen variieren. Sporen lassen sich dabei methodisch leichter lysieren als Myzelien und auch Myzelien unterschiedlichen Alters können unterschiedliche Lysiseigenschaften besitzen (PROSSER, 2002). Der Zusatzschritt mit den Glass Beads erwies sich bereits in früheren Studien als zielführend (MÜLLER ET AL., 1998) und resultierte in höheren DNA-Ausbeuten sowie geringeren Inhibitorkonzentrationen (OGRAM ET AL., 1987; LEFF ET AL., 1995; ROOSE-AMSALEG ET AL., 2001; LAKAY ET AL., 2007). Dies zeigte sich auch im Vorfeld dieser Studie, wo der Einsatz an Glass Beads bei der CTAB-Methode eine bis zu 10-fach höhere DNA-Ausbeute zur Folge hatte. Allerdings kann, trotz Einsatz von Glass Beads, die DNA-Isolierung oder die Befreiung der Proben von Inhibitoren wie Nukleasen, Polysaccharide und Pigmenten fehlschlagen und damit den Nachweis über PCR-Amplifikation im Folgenden nicht ermöglichen (MÜLLER ET AL., 1998; SMIT ET AL., 1999). So war es nach Durchführung der Methoden 2 und 3 z.T. nicht möglich, verschiedene *Stachybotrys chartarum*-Spezies, *Mucor spinosus* und *Rhizopus peca* zu amplifizieren. Zudem besteht beim Einsatz von Glass Beads die Gefahr, dass die DNA geschert und damit eine nachfolgende Detektion über PCR erschwert oder verhindert wird (OGRAM ET AL., 1987; VON WINTZINGERODE ET AL., 1997). Während bei DNA-Extraktionsmethoden ohne Zuhilfenahme physikalischer Verfahren die DNA-Fragmentgrößen in der Regel bei über 23 Kilobasen (kb) liegen und damit keine nennenswerte DNA-Scherung vorliegt (ZHOU ET AL., 1996), beobachteten OGRAM ET AL. (1987) und SIMONET ET AL. (1991) eine Fragmentlängenverteilung von 10 bis weniger als 0,5 kb nach Einsatz von Glass Beads. Dennoch hatte dies keine Auswirkungen auf die DNA-Qualität, sodass auch in der vorliegenden Studie die ITS-Fragmente von ca. 570-590 bp in nahezu allen Fällen ohne Quantitätsverluste amplifiziert werden konnten.

Bei der Auswahl des DNA-Extraktionsverfahrens wurde die Effizienz hauptsächlich durch die Amplifikation der gewonnenen DNA im Thermocycler und durch die nachfolgende Detektion im Agarosegel sowie durch das Detektionslimit der PCR-SSCP-Analyse (s.a. Punkt 5.1.3) in Abhängigkeit des vorgeschalteten Extraktionsverfahrens

beurteilt. Demnach wurde diese anhand qualitativer bzw. semi-quantitativer Methoden getroffen. Die Auswahl der zur Methodenevaluierung eingesetzten Pilzarten erfolgte gemäß den Angaben aus der Literatur bezüglich des Vorkommens in Haus- und Stallstaubproben (LUSTGRAAF, 1978; WASSENAAR, 1988; BEGUIN UND NOLARD, 1996; FLANNIGAN, 2001; FLANNIGAN UND MILLER, 2001; MULLINS, 2001; SAMSON UND HOUBRAKEN, 2001; O'CONNOR ET AL., 2004; NORMAND ET AL., 2009; EGE ET AL., 2011; RINTALA ET AL., 2012). Bezugnehmend auf die DNA-Extraktionseffizienz zeigten sich nur minimale Unterschiede zwischen den einzelnen Verfahren, wobei Methode 1 jedoch als einzige hervorging, mit der alle extrahierten Reinkulturspezies amplifiziert werden konnten. Da der PowerSoil™ DNA Isolation Kit als Methode der Wahl zudem zum niedrigsten Detektionslimit führte, wurde dieser für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

5.1.2 Primerauswahl

In dieser Studie wurden sechs universelle Pilz-Primerpaare, die in der Literatur bereits beschrieben wurden, methodenbezogen evaluiert. In bisherigen Studien wurden diese Primer jeweils separat für Pilzgemeinschaftsanalysen eingesetzt oder zumindest nicht vergleichend beschrieben (KUMEDA UND ASAO, 1996; PETERS ET AL., 2000; WU ET AL., 2002; ANDERSON ET AL., 2003; BRODIE ET AL., 2003; ANDERSON AND CAIRNEY, 2004; KUMAR UND SHUKLA, 2005; ZACHOW ET AL., 2009). Zwei Primerpaare amplifizieren ein Fragment des 18S rRNA Gens – 0817/1536 (BORNEMAN UND HARTIN, 2000) und NS7/NS8 (WHITE ET AL., 1990) – sowie eines ein Fragment des 28S rRNA Gens – U1/U2 (SANDHU ET AL., 1995). Die drei weiteren Primerpaare ITS1/ITS4 (WHITE ET AL., 1990), ITS1F/ITS4 (GARDES UND BRUNS, 1993) und Fun18sf/ITS4 (PITKÄRANTA ET AL., 2008) hatten die gesamte ITS-Region als Ziel, wobei der jeweilige forward Primer an die 18S rDNA bindet und der reverse Primer ITS4 an die 28S rDNA.

Für die Methodenentwicklung, d.h. für die Adaption der PCR-SSCP-Basismethode an die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Staubproben, wurde hauptsächlich mit Reinkulturen gearbeitet. Das Vorkommen dieser Spezies in der später verwendeten Matrix wurde hinreichend beschrieben (LUSTGRAAF, 1978; WASSENAAR, 1988; BEGUIN UND NOLARD, 1996; FLANNIGAN, 2001; FLANNIGAN UND MILLER, 2001; MULLINS, 2001; SAMSON UND HOUBRAKEN, 2001; O'CONNOR ET AL., 2004; NORMAND ET AL., 2009; EGE ET AL., 2011; RINTALA ET AL., 2012). Ziel war es, aus den eingesetzten Primerpaaren dasjenige mit der besten Eignung für die vorliegende Studie zu ermitteln.

Deshalb wurden die Primerpaare auf folgende Eigenschaften getestet: (1) Amplifikation eines möglichst breiten Spektrums an unterschiedlichen Pilzgenera/-spezies; (2) Ermöglichung der Separation von Banden unterschiedlicher Spezies im Polyacrylamidgel; (3) Anzahl zusätzlicher Banden im Polyacrylamidgel und (4) die Möglichkeit der Identifikation auf Speziesebene. Eine entsprechende Gewichtung der Einzelergebnisse wurde vorgenommen. Das gewählte Primerpaar sollte eine Bandenseparation über die gesamte Gellänge zulassen sowie ein Minimum an zusätzlichen Banden, aufgrund mehrerer stabiler Konformationen einer Einzelstrang-DNA-Struktur, im Polyacrylamidgel verursachen. Darüber hinaus wurde die klare Identifikation einer Pilzspezies als wichtig angesehen. Speziell bei den, in Hausstaubproben am häufigsten vorkommenden, Pilzgattungen *Aspergillus* und *Penicillium* (RINTALA ET AL., 2012, u.a.) mit mehr als 260 bzw. 570 unterschiedlichen Spezies und intraspezifischen Varianten (PITT ET AL., 2000; SAMSON UND VARGA, 2009) ist die Ermöglichung der Bestimmung auf Speziesebene von essentieller Bedeutung. „Makropilze“ mit eingeschlossen wird eine Anzahl von 1.500.000 Pilzspezies auf der Welt postuliert (GILLER ET AL., 1997). Mehr als 170.000 vollständige ITS-Sequenzen, generiert durch Sanger-Sequenzierung, sind mittlerweile in den Gen-Datenbanken hinterlegt (SCHOCH ET AL., 2012), und gerade durch die neue Technologie der Parallelsequenzierung nimmt diese Zahl weiter zu (BELLEMAIN ET AL., 2010). Dennoch ist zu beachten, dass teilweise die zugrundeliegenden Daten durch fehlerhafte Identifizierungen oder technische Probleme wie Vermischung von verschiedenen DNA-Templates oder Sequenzierfehler zustande gekommen sind und damit eine genaue Aussage erschweren (NILSSON ET AL., 2006). Aufgrund des wachsenden Referenzmaterials für die ITS-Region zeigten sich wohl auch die vorliegenden Unterschiede im Sequenzabgleich zwischen der Verwendung von ITS- oder 18S/28S rDNA-Primern. Generell war bei Abgleich der PCR-Produktsequenzen mit den Datenbankeneinträgen mit allen Primerpaaren eine Identifikation auf Genusebene in allen Fällen möglich. Das Ziel, eine Bestimmbarkeit auf Speziesebene zu ermöglichen, war allerdings mit den ITS-Primerkombinationen häufiger erreichbar.

Bei der Amplifikationseffizienz der eingesetzten 38 Reinkulturspezies ließen sich keine oder nur marginale Unterschiede, z.T. in Abhängigkeit des verwendeten DNA-Extraktionsverfahrens, feststellen. Während nach DNA-Extraktion mit dem PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) mit allen sechs Primerpaaren alle Proben amplifiziert werden konnten, war die Amplifikation von *Stachybotrys chartarum* S1114 (nach

GenElute™-Extraktion) bzw. von *Stachybotrys chartarum* S1495 (nach CTAB-Extraktion) in keinem Fall möglich. WU ET AL. (2002) untersuchten zwölf universelle Primerpaare nach DNA-Extraktion mit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) und dem Einsatz von Zirconia-Silica Beads. Sie konnten diese Problematik nicht beobachten, da alle zwölf Primerpaare in der Lage waren, *Stachybotrys chartarum* zu amplifizieren. Möglicherweise handelte sich hierbei um einen Stamm-spezifischen Effekt oder eine unzureichende Entfernung von inhibitorischen Substanzen durch die beiden Extraktionsverfahren (MÜLLER ET AL., 1998; SMIT ET AL., 1999). Umgekehrt beschrieben TURIN ET AL. (2000) und WU ET AL. (2002) ein Problem mit der Amplifikation von *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus niger* mit Primerpaar ITS1/ITS4. In der vorliegenden Studie wurde dies nicht festgestellt; dagegen konnten andere Studien bestätigt werden (z.B. VELEGRAKI ET AL., 1999), in denen beide Spezies mit allen Primerpaaren über alle Extraktionsverfahren amplifiziert werden konnten. Zudem zeigten sich auch im vorliegenden Fall größere Fragmente bei der Gruppe der *Mucorales* (*Rhizopus peca* und *Mucor spinosus*) nach Amplifikation mit den Primerpaaren U1/U2 und ITS1/ITS4 (WU ET AL., 2002). DORN-IN (2012) beschrieb eine eingeschränkte Amplifikation von getesteten Pilzen der Unterabteilung Mucormycotina mit den Primerpaaren 0817/1536 und ITS1F/ITS4. Dies trifft auch in der vorliegenden Studie auf DNA-Extrakte des CTAB-Verfahrens zu, jedoch nicht auf die anderen beiden Extraktionsverfahren, sodass generell eine Amplifikation von Vertretern dieser Unterabteilung möglich ist.

Die Durchführung der PCR-SSCP-Analyse von Pilzreinkulturen ergab eine starke Abhängigkeit zwischen der Qualität der Separation, dem verwendeten Primerpaar und der damit verbundenen Fragmentlänge des untersuchten DNA-Abschnitts. Publikationen berichten über eine abnehmende Sensitivität der PCR-SSCP-Analyse mit zunehmender Fragmentgröße und eine optimale Fragmentlänge von 150 bp (HAYASHI, 1991; SHEFFIELD ET AL., 1993; HAYASHI, 1997; KERR UND CURRAN, 1996; SUNNUCKS ET AL., 2000). Andere wiederum verwenden die PCR-SSCP-Methode auch für Fragmente bis zu einer Größe von 775 bp (ORTÍ ET AL., 1997). Die relativ kurzen Fragmente, die durch die Primerpaare NS7/NS8 (377 bp) und U1/U2 (260 bp) entstehen, ließen allerdings aufgrund ihrer zu geringen Sequenzvariabilität zwischen verschiedenen Pilzgenera/-spezies keine Unterscheidung zu. Für die Untersuchung von Pilzgemeinschaften wurde ein Zugewinn an Sequenzvariabilität mit zunehmender Fragmentlänge erwartet. Jedoch war auch die Auftrennung der langen Fragmente der

Primerpaare 0817/1536 (762 bp) und Fun18sf/ITS4 (770-800 bp) im Polyacrylamidgel nicht optimal. Generell erlaubten die Primerpaare mit der vergleichsweise konservierten Zielregion 18S oder 28S rDNA eine weniger gute Auftrennung der einzelnen Banden im Polyacrylamidgel als diejenigen Primerpaare, die die hoch-variable ITS-Region amplifizierten (IWEN ET AL., 2002; RYBERG ET AL., 2008). Aufgrund der nur geringen Längenvariation verschiedener PCR-Produkte unterschiedlicher Pilzspezies wurde ein Größeneffekt in der PCR-SSCP-Analyse bei Verwendung von ITS-Primern in dieser Studie nicht erwartet (LEE ET AL., 1996). Die Primerpaare ITS1/ITS4 und ITS1F/ITS4 zeigten die besten und nahezu identischen Separationsergebnisse in diesem Vergleich, sodass, trotz der relativen langen Fragmente (570-590 bzw. 600-630 bp), ein gutes Trennergebnis im Polyacrylamidgel einer höheren Sensitivität vorgezogen wurde. Allerdings wiesen auch diese beiden Primerpaare Schwächen bezüglich der Trennung von verschiedenen Spezies der Gattungen *Aspergillus/Eurotium* auf. Erklären lässt sich dies durch identische ITS-Sequenzen bei verschiedenen Gruppen von Aspergilli, sodass weitere Marker für eine spezifische Identifikation notwendig sind (GEISER ET AL., 2007).

Zusätzliche Banden wurden bei allen sechs Primerpaaren in unterschiedlicher Häufigkeit bei der PCR-SSCP-Analyse von Reinkulturen im Polyacrylamidgel festgestellt. Diese zusätzlichen Banden entstehen durch multiple stabile Konformationen der einzelsträngigen DNA aufgrund hohen GC-Gehalts oder fehlerhafter bzw. ausbleibender Renaturierung/Faltung der einzelsträngigen DNA unter bestimmten Bedingungen (ORTÍ ET AL., 1997; SUNNUCKS ET AL., 2000). Darüber hinaus können die zusätzlichen Banden durch Zusammenlagerung der Einzelstränge zu doppelsträngigen Homoduplex-Strukturen entstanden sein (ATKINSON UND ADAMS, 1997). Dies bedeutet allerdings, dass die Intensität der einzelnen Banden eines PCR-SSCP Profils nicht für eine exaktere quantitative Aussage herangezogen werden kann. Zudem ist damit eine Korrelation zwischen Bandenanzahl je PCR-SSCP-Profil und Diversität schwierig (SCHWIEGER UND TEBBE, 1998).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass das wohl am häufigsten zur Amplifikation von Pilz-DNA verwendete (BELLEMAIN ET AL., 2010; Vilgalys lab, Duke University) Primerpaar ITS1/ITS4 (WHITE ET AL., 1990) die besten Ergebnisse bei dieser objektiven Evaluierung von sechs universellen Pilz-Primerpaaren zeigte. Dies bekräftigte den Vorschlag von SCHOCH ET AL. (2012), die ITS-Region als DNA-Barcode für Pilze anzusehen. Der Primer ITS1 amplifiziert dabei bevorzugt

Basidiomycota, während der Primer ITS4 v.a. *Ascomycota* amplifiziert (BELLEMAIN ET AL., 2010).

Allerdings darf ein Punkt nicht außer Acht gelassen werden: Total-DNA-Isolate aus Umweltmatrizes beinhalten in der Regel nicht nur DNA von Pilzen, sondern auch DNA von Bakterien, Viren, Pflanzen und tierischen/menschlichen Zellen. Bakterielle und virale DNA-Strukturen sind evolutorisch weit vom DNA-Aufbau der Pilze entfernt. Jedoch gehören sowohl die Zellen von Pilzen als auch von Pflanzen und Tieren/Menschen zu den Eukaryoten, weshalb generell die Möglichkeit besteht, dass Pilz-spezifische Primer auch DNA von pflanzlichen und tierischen Zellen amplifizieren können (WHITE ET AL., 1990; HAGN ET AL., 2003). Im Rahmen von Vorversuchen wurden sowohl (sub-) urbane Matratzen- als auch Stall- und Matratzenstaubproben aus dem bäuerlichen Umfeld eingesetzt und analysiert. Nach DNA-Isolierung und PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 war bei den städtischen Proben ausschließlich das in der Literatur mit einer Länge von 570-590 bp beschriebene Fragment im Agarosegel nachweisbar (WHITE ET AL., 1990). Bei Verwendung der Staubproben vom Bauernhof war zusätzlich jedoch auch ein ca. 700-750 bp großes Fragment erkennbar, welches durch Sanger-Sequenzierung und Datenbankenabgleich mit pflanzlicher DNA assoziiert werden konnte (s.a. DORN-IN, 2012). Das Auffinden pflanzlicher DNA in den Bauernhofproben lag vermutlich hauptsächlich an dem erhöhten Eintrag von Pflanzenbestandteilen aus der Umgebung in die jeweilige Probe, was im städtischen Umfeld in geringerem Umfang stattfindet. Aufgrund des Größenunterschieds beider Fragmente war allerdings eine Separation des Pilz-spezifischen ITS1/ITS4-PCR-Amplifikats mit Hilfe von Gelextraktion möglich.

In bisherigen Veröffentlichungen wurde die mögliche Amplifikation pflanzlicher DNA mit universellen Pilz-Primern nur am Rande behandelt und kein Vergleich von den am häufigsten verwendeten Primerpaaren, die wie ITS1/ITS4 bereits zu Anfang der 1990er Jahre entwickelt wurden (WHITE ET AL., 1990, GARDES UND BRUNS, 1993), mit „neueren“ Primerpaaren durchgeführt (MARTIN UND RYGIEWICZ, 2005; BELLEMAIN ET AL., 2010). BELLEMAIN ET AL. (2010) und DORN-IN (2012) berichteten in ihren vergleichenden Studien nun von einer starken Amplifikation von pflanzlicher DNA mit Primerpaar ITS1/ITS4. Allerdings trifft dies auch auf die weiteren in dieser Studie vorgestellten Primerkombinationen NS7/NS8 (s.a. WHITE ET AL., 1990), U1/U2 und Fun18sf/ITS4 (s.a. PITKÄRANTA ET AL., 2011) zu. Einzig mit den Primerpaaren 0817/1536 und ITS1F/ITS4 wurde keine oder nur in geringem Umfang pflanzliche

DNA nachgewiesen (BELLEMAIN ET AL., 2010; DORN-IN, 2012). Primerpaar 0817/1536 zeigte in dieser Studie jedoch eine schlechtere Bandenauffrennung sowie mehr zusätzliche Banden im Polyacrylamidgel als das Primerpaar ITS1/ITS4. Zudem wies BELLEMAIN ET AL. (2010) eine hohe Anzahl an Fehlern gegenüber der Zielsequenz, die während der PCR taxonomische Auswirkungen verursachen, bei dem Primer ITS1F nach.

Aufgrund dessen und der besten Ergebnisse bezüglich der Identifizierbarkeit von Pilzen auf Speziesebene blieb die Entscheidung für das Primerpaar ITS1/ITS4 für diese Studie bestehen. Um das Risiko der Amplifikation nicht-pilzlicher DNA zu minimieren, wurde das eigentliche ITS1/ITS4-Fragment (570-590 bp) mittels Gel-extraktion vorselektiert und damit pflanzliche DNA weitestgehend aus den Proben entfernt. Neben der Amplifikation pflanzlicher DNA und DNA von Pilzen wurde bei der Untersuchung der Feldproben allerdings mit diesem Primerpaar der Wahl auch *Dermanyssus gallinae* (rote Vogelmilbe) – und damit DNA von Insekten – nachgewiesen. In bisherigen Veröffentlichungen wurde davon nicht berichtet; die molekularbiologische Detektion von *De. gallinae* erfolgte in der Regel über 16S rDNA-Analysen oder mit Hilfe anderer ITS-Primer (DESLOIRE ET AL., 2006; POTENZA ET AL., 2009).

5.1.3 Kulturunabhängige Untersuchungen von Pilzgemeinschaften mittels PCR-SSCP

Schätzungen zufolge können nur < 1 bis 79 % der mikrobiellen Biomasse mit kulturbasierten Methoden nachgewiesen werden (TOIVOLA ET AL., 2004; NIEMEIER ET AL., 2006). Die Kultivierung von Pilzen ist meist durch die Auswahl des Kulturmediums (TAKAHASHI, 1997) und die Unfähigkeit der Detektion von nicht oder nur schwer kultivierbaren Mikroorganismen (AMANN ET AL., 1995; THORN, 1997; DOUWES ET AL., 1999; VAN ELSAS ET AL., 2000; MEKLIN ET AL., 2004; LIGNELL ET AL., 2008), welche aber potenziell Allergene oder Pathogene sind (HIRVONEN ET AL., 1997), vorbestimmt. Nicht lebensfähige Pilze, die aber dennoch, aufgrund ihrer allergenen Proteine, klinisch interessant sind, können nicht bestimmt werden (KAUFFMAN UND VAN DER HEIDE, 2003). Des Weiteren sind für die mikroskopische und phänotypische Bestimmung ein hohes Maß an Erfahrung und Expertise notwendig (YAMAMOTO ET AL., 2011). Zusätzlich werden bei der Kultivierung diejenigen Pilze mit hohen Wachstumsraten und vielen Sporen in der Probe bevorzugt und damit eine quantitative Aussage über die

Diversität in der Gemeinschaft erschwert (DIX UND WEBSTER, 1995; MACNEIL ET AL., 1995; HUGENHOLTZ UND PACE, 1996).

Kulturunabhängige Methoden können helfen, Probleme der kulturellen Diversitätsbestimmung zu umgehen und damit die traditionelle Identifikation um die Detektion von bisher nicht oder nur schwer kultivierbaren Pilzen zu erweitern (KIRK ET AL., 2004; YAMAMOTO ET AL., 2011; SHENDELL ET AL., 2012). Zahlreiche bereits bekannte, molekularbiologische Techniken wurden für die Untersuchung von mikrobiellen Gemeinschaften in den letzten Jahrzehnten optimiert. Jedes dieser Verfahren weist aber wiederum für sich spezielle Vor- und Nachteile auf (KIRK ET AL., 2004). Durch die Auswahl der bakteriellen 16S rDNA sowie der 18S rDNA und der ITS-Region der Pilze als phylogenetische Marker (WOESE ET AL., 1990; STACKEBRANDT UND GOEBEL, 1994; HUGENHOLTZ UND PACE, 1996; BEGEROW ET AL., 2010; SCHOCH ET AL., 2012) sind mittlerweile PCR-basierte Anwendungen bei taxonomischen Untersuchungen und Diversitätsanalysen am verbreitetsten (KIRK ET AL., 2004). Dazu gehören DGGE/TGGE (MUYZER ET AL., 1993), (T-) RFLP (LIU ET AL., 1997; TIEDJE ET AL., 1999) und (A)RISA (FISHER UND TRIPLETT, 1999). Darüber hinaus ließen sich HAUGLAND UND VESPER (2002) von der amerikanischen Umweltschutzbehörde EPA (Environmental Protection Agency) das Standardverfahren der MSQPCR (Mold-Specific qPCR) für die quantitative Untersuchung der Exposition gegenüber den 130 häufigsten Pilzen in der Raumluft patentieren. Dieses setzte sich in den vergangenen Jahren immer mehr durch (MEKLIN ET AL., 2004; KESWANI ET AL., 2005; VESPER ET AL., 2007A UND B; PIETARINEN ET AL., 2008; YAMAMOTO ET AL., 2011 UND 2012).

Die Menge an Referenzsequenzen für Pilze in den öffentlichen Datenbanken wächst, ist aber immer noch deutlich geringer als für Prokaryoten und sollte dringend weiter ausgebaut werden (PROSSER, 2002; BEGEROW ET AL., 2010). Limitierende Aspekte bei der Anwendung PCR-basierter Methoden für die Diversitätsbestimmung liegen in der Effizienz der DNA-Extraktion (s. Punkt 5.1.1) und der Amplifikation des jeweiligen DNA-Abschnitts, wobei hauptsächlich die Auswahl eines geeigneten Primerpaares (s. Punkt 5.1.2) für die Hybridisierungseffizienz und Spezifität verantwortlich ist (VON WINTZINGERODE ET AL., 1997). Darüber hinaus zeigen auch diese Verfahren eine Bevorzugung dominanter Spezies in der Probe (MACNAUGHTON ET AL., 1999; KIRK ET AL., 2004).

Die Methode der Wahl für diese Studie war die PCR-SSCP-Analyse, welche ursprünglich für die Untersuchung von DNA-Polymorphismen oder -Punktmutationen entwickelt wurde (ORITA ET AL., 1989). Diese lieferte bereits in früheren Studien aussagekräftige Ergebnisse bei der Untersuchung von Bakterien- und Pilzgemeinschaften in unterschiedlichen Matrices (KUMEDA UND ASAO, 1996; SCHWIEGER UND TEBBE, 1998, PETERS ET AL., 2000; SCHMALENBERGER ET AL., 2001; KUMAR UND SHUKLA, 2004; KORTHALS ET AL., 2008A UND B; EGE ET AL., 2011; DORN-IN, 2012 UND 2013) und produzierte zudem schärfere Banden bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese als die DGGE-Analyse (HORI ET AL., 2006; KORTHALS, 2009). Wie unter Punkt 5.1.2 bereits erwähnt, können die einzelsträngigen DNA-Sequenzen eine dominante Konformation, darüber hinaus jedoch auch weitere stabile Konformationen, einnehmen (ORTÍ ET AL., 1997; SUNNUCKS ET AL., 2000), sodass eine Sequenz durch mehrere Banden im Polyacrylamidgel repräsentiert werden kann und damit in der Regel eine Bande nicht eine Pilzspezies darstellt (TIEDJE ET AL., 1999). Zudem kann bereits ein Basenaustausch zu einer völlig anderen 3D-Struktur der einzelsträngigen DNA und, damit verbunden, zu einem anderen Laufverhalten im Gel führen (ORITA ET AL., 1989). Aus diesem Grund ist eine direkte Zuordnung und Identifikation einer Pilzspezies über den eingesetzten Speziesstandard nicht möglich, was eine nachgeschaltete Sequenzierung der gewählten Bande zur Bestimmung der zugrundeliegenden Pilzspezies notwendig macht (SCHWIEGER UND TEBBE, 1998; PETERS ET AL., 2000). Dennoch ist der Speziesstandard, gerade bei großer Probenanzahl, für die Normalisierung der einzelnen Bandenprofile bei Gel-zu-Gel-Vergleichen unentbehrlich, um so spezifische, dominante Banden für eine bestimmte Gruppe von Proben durch Profilvergleiche identifizieren zu können.

Robustheit und Reproduzierbarkeit einer Methode ist gerade bei der Anwendung für epidemiologische Studien, wie hier für die Untersuchung von Matratzenstaubproben der GABRIEL-Studie (GENUNEIT ET AL., 2011) bezüglich Assoziationen zwischen Pilzexposition und kindlichem Asthma, wichtig. Gel-basierte Techniken wie DGGE und PCR-SSCP wurden jedoch in verschiedenen Publikationen als schlecht reproduzierbar beurteilt (NUNAN ET AL., 2005; HONG ET AL., 2007). Die in dieser Studie ermittelten Werte von 88 bis 93 % (Mittelwerte) Übereinstimmung von Bandenprofilen unterschiedlicher Stall- und Hausstaubproben – innerhalb eines Gels oder im Vergleich mehrerer Polyacrylamidgele sowie in Abhängigkeit des DNA-Extraktionstags – stellten allerdings durchaus akzeptable Reproduzierbarkeitswerte dar. Diese sind zudem

mit den PCR-SSCP-Analysen von Bakteriengemeinschaften von KORTHALS ET AL. (2008A), bei denen die Werte eine Spanne von 89 bis 95 % aufwiesen, sowie mit DGGE-Analysen (LYAUTEY ET AL., 2003; POWELL ET AL., 2003; SMALLA ET AL., 2007) vergleichbar. Der geringste Übereinstimmungswert von im Mittel 88 % für den Gel-zu-Gel-Vergleich könnte an minimalen und unvermeidbaren Veränderungen bei den PCR-SSCP Bedingungen (v.a. der Temperatur) gelegen haben, was zu leichten Unterschieden in den Laufweiten führt und damit die Ähnlichkeit der Profile erniedrigt. Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass die Übereinstimmungswerte geringer waren je komplexer die eingesetzte Probe war. Beim Vergleich der Bandenprofile ein und derselben Probe innerhalb eines Gels stimmten die untersuchten fünf Profile des Hühnerstallstaubs (geringste Anzahl an Banden) zu 98,2 % überein, während die Profile des Matratzenstaubs (höchste Anzahl an Banden) lediglich zu 86,1 % übereinstimmten.

Bei der Bestimmung des Detektionslimits der entwickelten PCR-SSCP-Methode mit initialer DNA-Extraktion mittels PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) und PCR-Amplifikation mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 (WHITE ET AL., 1990) wurden drei Pilzspezies – *Cladosporium herbarum*, *Eurotium amstelodami* und *Penicillium chrysogenum* – eingesetzt (s.a. KORTHALS ET AL., 2008A). Dadurch wurde künstlich eine Konkurrenz der unterschiedlichen Fragmente in der PCR erzeugt. Das ermittelte Detektionslimit lag bei 200 CFU/g Staub für *E. amstelodami*, was je nach Studie im Bereich der nachweisbaren Sporenkonzentration in Hausstaub liegt (KORPI ET AL., 1997; ORTÍ ET AL., 1997; SUNNUCKS ET AL., 2000; HYVÄRINEN ET AL., 2002). Der Nachweis von *Cl. herbarum* und *P. chrysogenum* war aufgrund der Konkurrenzsituation der Pilzsporen bei der Einstellung der Verdünnungsstufen und bei der DNA-Extraktion sowie der isolierten DNA bei der PCR-Amplifikation erst in höheren Konzentrationen möglich. Die Sensitivität des Testsystems für die Untersuchung von Pilzen in Hausstaubproben ist dennoch als ausreichend zu beurteilen.

5.1.4 Quantitative Bestimmung der Pilzexposition

Pilzsporen und deren Bestandteile wie Exopolysaccharide oder beta-1,3-Glucan sowie die von den Pilzen gebildeten Mykotoxine sind als mögliche Auslöser diverser Erkrankungen, v.a. des respiratorischen Systems und der Haut, bekannt (HORNER ET AL., 1995; ROSSMANN ET AL., 1995; JARVIS AND MILLER, 2004; RADON ET AL., 2004; SINGH UND SCHWARTZ, 2005; PEKKANEN ET AL., 2007). Aus diesem Grund ist die Messung der Stärke der Pilzexposition, neben der qualitativen Detektion von Pilzen über konventionelle PCR oder PCR-SSCP, von großer Bedeutung (KESWANI ET AL., 2005; KAARAKAINEN ET AL., 2009), da vermutlich eine Assoziation zwischen Symptomatik und Expositions-dosis besteht (DAY UND ELLIS, 2001). Zur Quantifizierung bietet sich die quantitative PCR (qPCR) an, die bereits erfolgreich bei der Quantifizierung der mikrobiellen Exposition eingesetzt wurde (MACKAY, 2004). Kulturelle Methoden sind für eine genaue Bestimmung schlechter geeignet, da sie die Konzentration an Pilzen schätzungsweise um das 2- bis 3-fache unterschätzen (MEKLIN ET AL., 2004). Die PCR-SSCP-Analyse ist für eine quantitative Aussage, aufgrund des Gemisches an Sequenzen unterschiedlicher Pilzspezies je Profilbande (TIEDJE ET AL., 1999), nicht anwendbar.

In der vorliegenden Studie wurde keine Bestimmung der Sporenkonzentration in Stall- und Hausstaubproben durchgeführt. Allerdings sollen im Folgenden einige kritische Punkte bezüglich dem, für die PCR-SSCP-Analyse evaluierten, Primerpaar ITS1/ITS4 hinsichtlich eines möglichen Einsatzes bei der quantitativen Bestimmung aufgeführt werden. Dieses ist für die qPCR-Anwendung ungeeignet, da es, wie bereits unter Punkt 5.1.2 beschrieben, in nicht unerheblichem Ausmaß pflanzliche DNA amplifizieren kann (WHITE ET AL., 1990; BELLEMAIN ET AL., 2010; DORN-IN, 2012) und damit zu einer Überschätzung der Konzentration an Pilzen in der ursprünglichen Probe führen würde. Außerdem zeigte die Analyse einer Hühnerstallstaubprobe (s.a. Punkt 5.2) zum ersten Mal den Nachweis des ITS-Fragments von *Dermanyssus gallinae* (rote Vogelmilbe) mit dem Pilz-Primerpaar ITS1/ITS4, was zu einer zusätzlichen Überschätzung der Konzentration führen würde. Da die Milbe zwar hauptsächlich Hühnervogel, aber auch Wildvögel, Kanarienvogel und z.T. Säugetiere wie den Menschen befällt (CHAUVE, 1998; BELLANGER ET AL., 2008; CIRCELLA ET AL., 2011), kann diese Problematik nicht nur Stallstaub-, sondern auch z.B. Hausstaubproben betreffen. Bisher gibt es allerdings noch keine Vergleichsstudien, die ITS1/ITS4 für die quantitative Analyse mittels qPCR verwendet haben.

5.2 Untersuchungen zur Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben

Verschiedene Staubproben aus dem Hühnerstall, Schweinestall und Kuhstall sowie von Matratzen wurden mittels Kultivierung auf Sabouraud- und DG18-Agar, PCR-SSCP und Parallelsequenzierung untersucht. Bei der PCR-SSCP-Analyse wurden zehn dominante Banden für die Sanger-Sequenzierung ausgewählt. Die Ergebnisse der drei Verfahren stimmten hinsichtlich der dominanten Genera/Spezies in allen Fällen überein.

5.2.1 Kultivierungsversuche

Bei den Kultivierungsversuchen wurde die Bestimmung der Pilze auf die Gensebene beschränkt. Sie dienten der Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse der Sanger- und Parallelsequenzierung bezüglich dominanter Vertreter in der jeweiligen Probe. Bei der Schweinestallstaubprobe war eine kulturelle Bestimmung auf Sabouraud-Agar nicht möglich, da ein Vertreter der *Mucor*-verwandten Pilze (*Mucorales*) die Agarplatte überwucherte. Dies wurde bereits durch andere Studien beschrieben (u.a. SAMSON UND HOUBRAKEN, 2001) und bestätigt noch einmal die Beobachtungen, dass kulturelle Verfahren schnell wachsende Pilze und solche mit starkem Vorkommen in der Probe bevorzugen (DIX UND WEBSTER, 1995; MACNEIL ET AL., 1995; HUGENHOLTZ UND PACE, 1996). Verschiedene Zusätze – wie Polyoxin D (BECKER ET AL., 1983), Cycloheximid (HAIDLE UND STORCK, 1966) oder Sesamol (WYNN ET AL., 1997) – werden in der Literatur als mögliche Wachstumsinhibitoren für *Mucor* spp. genannt. All diese zeigten jedoch auch eine hemmende Wirkung gegenüber anderen Pilzen, wie z.B. gegen *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* bei Polyoxin D (BECKER ET AL., 1983), und sind deshalb für eine kulturelle Diversitätsanalyse ungeeignet. KING ET AL. (1979) fanden bei der Suche nach geeigneten Medienzusätzen für die Isolierung von Pilzen verdorbener Lebensmittel Dichloran (2,6-Dichloro-4-Nitroanilin), welches alleine oder in Kombination mit Bengalrosa einen inhibierenden Effekt auf die Ausbreitung der *Mucorales* auf dem Agar, aber keine vollständige Hemmung, ausübte und zudem den Durchmesser der Pilzkolonien insgesamt limitierte. So war es auch in dieser Studie möglich, im Gegensatz zum überwucherten Sabouraud-Agar, auf dem DG18-Agar neben dem *Mucor*-Verwandten auch weiße Hefen zu detektieren. Aus diesem Grund wurde Dichloran später als Basissubstanz für den nach ihm benannten Dichloran-Glycerin (DG18)-Agar (HOCKING UND PITT, 1980) eingesetzt.

5.2.2 PCR-SSCP-Analyse und Sanger-Sequenzierung

Die PCR-SSCP-Analyse der Stall- und Matratzenstaubproben wurde einerseits zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit (s. Punkt 5.1.3) und andererseits für das Aufzeigen der Anwendbarkeit der entwickelten Methode auf hochdiverse Umweltproben durchgeführt. Hauptaugenmerk lag hierbei auf der späteren Bestimmbarkeit von ausgewählten Polyacrylamidgel-Profilbanden des ITS1/ITS4-Fragments auf Speziesebene nach Sanger-Sequenzierung. Zehn Banden, die sich über das gesamte Polyacrylamidgel erstreckten, wurden ausgewählt, die einzelsträngige DNA aus dem Gel isoliert (PETERS ET AL., 2000) und die Proben mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 reamplifiziert. Entgegen der Meinung von SCHWIEGER UND TEBBE (1998), woraufhin die Reinheit dieser Probe bzw. die Effizienz der Reamplifikation durch co-migrierte oder kontaminierende DNA anderer Vertreter der Pilzgemeinschaft beeinträchtigt sein könnte und deshalb die Klonierung der DNA vor der Sanger-Sequenzierung vorgeschlagen wurde, wurde die DNA in diesem Fall direkt sequenziert. Dadurch verringerte sich der methodische Aufwand. Alle zehn editierten Sanger-Hauptsequenzen konnten nach Abgleich der Datenbankeinträge in NCBI-BLAST und CBS-KNAW auf Speziesebene identifiziert werden. Dies bestätigte, dass mittlerweile eine große Anzahl hochqualitativer Referenzsequenzen in den Datenbanken vorliegt (SCHOCH ET AL., 2012) und deren Anzahl inzwischen für die ITS-Region gegenüber der 18S und 28S rRNA Gene sowie beta-Tubulin und CO1 (mitochondriale Cytochrom c Oxidase Untereinheit 1) am größten ist (BEGEROW ET AL., 2010). In neun von zehn Fällen stimmten zudem die Ergebnisse der beiden Datenbanken überein. Im zehnten Fall ließ jedoch die Datenbank von CBS-KNAW eine spezifischere Aussage zu. DU ET AL. (2012) erwähnten sogar eine 66%ige Fehlidentifikation von *Morchella*-Sequenzen bei GenBank (NCBI-BLAST). Demnach ist bei der Sequenzspezifizierung ein Vergleich der Suchergebnisse mehrerer Datenbanken sinnvoll.

Die Hühnerstallstaubprobe enthielt dominante Sequenzen von *Microdochium nivale* (Schneeschnitzpilz) und *Cryptococcus victoriae* sowie von *Dermanyssus gallinae*. *De. gallinae* ist als Vogelmilbe stark mit Geflügel assoziiert (CHAUVE, 1998). Die Detektion von *De. gallinae* war aber nicht nur auf Hühnerstallstaubproben beschränkt, sondern auch bei Untersuchungen mittels Parallelsequenzierung in zwei Matratzenstaubproben möglich (s. Tabelle 25 und Tabelle 39). *Microdochium nivale* ist der häufigste Schädling von Rasengras (SMILEY ET AL., 1992), kommt jedoch auch bei agrarwirtschaftlichen Erzeugnissen wie Weizen und Mais vor (SIMPSON ET AL., 2000) und kann

überdies auch in den Hühnerstall übertragen worden sein (SAYER UND LAUREN, 1991). Auch das Vorhandensein von *Cryptococcus* spp. in Verbindung mit Hühnern wurde bereits in der Literatur beschrieben (FRAISON ET AL., 2012). KARWOWSKA (2005) berichtete von *Aspergillus* sp. (*A. niger*, *A. nidulans* und *A. ochraceus*), *Penicillium notatum*, *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. und *Alternaria* sp. als häufigste Schimmelpilzspezies in Geflügelställen in Polen.

Die häufigsten Vertreter in den Schweinestallstaubproben waren, mit Ausnahme des ubiquitär vorkommenden Pilzes *Epicoccum nigrum* (MEYER ET AL., 1983; AMEND ET AL., 2010B), auch hier *Microdochium nivale* (s.o.) sowie verschiedene *Candida* spp. (*C. catenulata* und *C. cabralensis*). Dies war konträr zu anderen kulturellen Studien, bei denen die Hauptvertreter der Pilze in diesem Stalltyp *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. und *Cladosporium* sp. waren (MARTIN ET AL., 1996; KARWOWSKA, 2005). In Einklang mit diesen Studien war jedoch die Detektion eines *Mucorales*-Vertreters (*Mucor* sp., *Rhizopus* sp. oder *Absidia* sp.) bei den in der vorliegenden Studie durchgeführten kulturellen Verfahren. Das Fehlen eines Mucormycotina-Pilzes bei den dominanten Ergebnissen der PCR-SSCP-Analyse und der Parallelsequenzierung könnte einerseits an einer fehlerhaften DNA-Extraktion aus den Sporen und Hyphen dieser Vertreter oder einer nicht vorhandenen Amplifikation mit Primerpaar ITS1/ITS4 gelegen haben. Beides ist jedoch eher unwahrscheinlich, da dies in den Vorversuchen nicht beobachtet wurde (s.a. Punkte 5.1.1 und 5.1.2). Wahrscheinlicher ist, dass aufgrund einer inhomogenen Probenverteilung Sporen und/oder Hyphen von *Mucorales*-Vertretern zufälligerweise in denjenigen Staubproben nicht enthalten waren, die für die DNA-Extraktion und der nachfolgenden PCR-SSCP-Analyse und Parallelsequenzierung ausgewählt wurden. Bezugnehmend auf die weiteren identifizierten Pilzspezies in der Schweinestallstaubprobe zeigte sich, dass *Candida catenulata* u.a. als dominante Hefe neben *Galactomyces geotrichum* und *Kazachstania slooffiae* im Gastrointestinaltrakt von Schweinen in Deutschland gefunden wurde (URUBSCHUROV ET AL., 2008). *C. cabralensis* wurde erstmals im Jahr 2010 nach der Isolation aus Blauschimmelkäse als neue Hefespezies postuliert. Phylogenetische Studien zeigten eine enge Verwandtschaft mit *Pichia terricola* und *Pichia fermentans* (FLORÉZ ET AL., 2010).

Frühe Studien von BARUAH (1961) in Indien identifizierten *Aspergillus* sp., *Mucor*-ähnliche Spezies sowie *Cladosporium* sp. als dominante Pilze in Kuhställen. Dies wurde durch KARWOWSKA (2005) und REBOUX ET AL. (2006) um Spezies von *Peni-*

cillium, *Alternaria*, *Monilia*, *Wallemia* und *Aspergillus/Eurotium* erweitert und durch VOGEL ET AL. (2008) und LUGAUSKAS ET AL. (2009) bestätigt. Zudem konnten VOGEL ET AL. (2008) einen Transfer von *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp. und *Wallemia* sp. aus dem Kuhstall ins Bauernhaus nachweisen. In der vorliegenden Studie konnten die Ergebnisse hinsichtlich der häufig vorkommenden *Cladosporium* sp. verifiziert werden.

Die getesteten Matratzenstaubproben vom gleichen Bauernhof wie die Kuhstallproben wiesen ebenfalls in 2 von 3 Fällen Sequenzen von *Cladosporium* spp. auf. Zudem konnten durch die Parallelsequenzierung weitere, in der Literatur als im-Kuhstall-vorkommend beschriebene und von dort auf Matratzen transferierte Spezies identifiziert werden (s.o.): *Alternaria* sp., *Galactomyces geotrichum*, *Geotrichum geotrichum* und *Geotrichum candidum*.

Die Ergebnisse der PCR-SSCP-Analyse und der nachfolgenden Sanger-Sequenzierung ausgewählter Banden bestätigten die Aussagen von SCHWIEGER UND TEBBE (1998) und TIEDJE ET AL. (1999), dass in der Regel eine Bande nicht eine spezifische Pilzspezies repräsentiert. Verschiedene Pilzspezies einer Gemeinschaft können, aufgrund ähnlicher Laufeigenschaften der sequenzspezifischen Struktur der Einzelstrang-DNA im Polyacrylamidgel, co-migrieren, sodass auch eine Zuordnung über den eingesetzten Speziesstandard nicht möglich war. Vier ausgewählte Banden wiesen eine ähnliche Laufweite wie Banden des Speziesstandards auf. In keinem Fall konnte die jeweilige Standardspezies als Hauptsequenz in der isolierten Bande gefunden werden.

5.2.3 Parallelsequenzierung zur Bestimmung der Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben

Die Parallelsequenzierung wurde zum Vergleich mit der PCR-SSCP-Analyse und nachfolgender Sanger-Sequenzierung angewandt. Bei dieser Analyse wurden zunächst nur die häufigsten, unigenen, d.h. 100 % übereinstimmenden, Sequenzen jeder Probe ausgewertet. In nachfolgenden Versuchen (s.a. Punkt 5.3.2) wurden die Proben in sogenannten OTUs (Operating Taxonomic Units) zusammengefasst, indem alle Sequenzen mit mindestens 97%iger Übereinstimmung zu einer OTU gruppiert wurden. Eine Referenzsequenz je OTU wurde daraufhin mit den Einträgen in den Datenbanken abgeglichen. Diese intraspezifische ITS-Variabilität bei Pilzen von 0-3 % wurde von mehreren Autoren als generell anwendbar beschrieben (COHAN,

2002, IZZO ET AL., 2005; CIARDO ET AL., 2006). Dies scheint zwar nicht für alle Pilzspezies zuzutreffen, aber zumindest den Großteil abzudecken (NILSSON ET AL., 2008). Andere wiederum lassen eine Divergenz von 3,5 % zu (NONNENMANN ET AL., 2012).

Es sollte überprüft werden, ob die Bestimmung der dominanten Vertreter nach semi-quantitativer Auswahl der stärksten Banden aus dem Polyacrylamidgel mit der Häufigkeit an Sequenzen bei der Parallelsequenzierung übereinstimmen. Dies war, wie oben bereits erwähnt, in jeder Probe der Fall, wodurch die Ergebnisse beider Verfahren bestätigt wurden. Zudem zeigte sich auch beim Vergleich der Verwendung der nativen DNA-Extrakte mit unterschiedlichen Amplikonlängen und der vorselektierten PCR-Produkte (570-590 bp-Fragment) eine deutliche Übereinstimmung. Aufgrund der Vorgaben des Herstellers, die den maximalen Fragmentlängenunterschied auf 150 bp festlegen, wurde eine Selektion des Pilz-spezifischen ITS1/ITS4-Fragments von 570-590 bp bei den weiteren Analysen analog zur PCR-SSCP-Methode vorgenommen. Damit wurden nicht nur pflanzliche Störfaktoren minimiert (s. Punkt 5.1.2), sondern zudem auch eine Überrepräsentation von kürzeren Sequenzen mancher Hefen mit einer Amplikonlänge von etwa 350 bp verhindert (s. Punkt 4.2.3), welche aufgrund ihrer geringeren Länge effizienter von der DNA-Polymerase amplifiziert werden (SUZUKI UND GIOVANNONI, 1996). Darüber hinaus war die Vorauswahl des Pilz-spezifischen Fragments im Vorfeld der Sequenzierung notwendig, um keine Primerdimere (100-150 bp) in die weitere Probenvorbereitung einzusetzen. Diese verringern ebenfalls die Ausbeute an hochqualitativen Sequenzen aufgrund ihrer geringeren Länge (s.o.). Die Entstehung von Dimeren bei Einsatz der ITS1/ITS4-Primerkombination wurde hierbei erstmals im Rahmen dieser Studie beobachtet. Mutmaßlich waren hierfür die langen Primerkonstrukte (Amplicon Fusion Primer; ca. 60 bp) der 454 Pyrosequenzierungstechnologie verantwortlich, da beim Einsatz der „nativen“ Primer ITS1 und ITS4 bisher in keinem Fall eine Bildung von Primerdimeren beobachtet wurde. Dieses Phänomen wurde jedoch vom Hersteller bislang nicht beobachtet und auch bis dato nicht in der Literatur beschrieben.

Anzumerken ist zudem, dass ein wissenschaftlicher Disput über die Möglichkeit der quantitativen Beurteilung der Parallelsequenzierdaten herrscht (AMEND ET AL., 2010A). Mit dem Einsatz der Parallelsequenzierung auf Basis der Pyrosequenzierung wurde in den letzten Jahren eine schnellere Charakterisierung von mikrobiellen Gemeinschaften mit größerer Sequenzierungstiefe erzielt als dies bisher über die Sanger-Sequenzierung möglich war (SOGIN ET AL., 2006). Die Anzahl an Studien, die

sich diese Technologie auch für die Untersuchung der Mykobiota zu Nutze machen, wächst (NILSSON ET AL., 2008; JUMPPONEN UND JONES, 2009; AMEND ET AL., 2010B; PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012). Eine häufige Annahme hierbei, wie auch in dieser Studie, war und ist, dass die Sequenzhäufigkeit mit taxonomischer Häufigkeit korreliert, d.h. dass der häufigste Vertreter der Gemeinschaft auch am häufigsten in den Daten der Sequenzierung auftritt. Gründe, die gegen diese Vermutung sprechen, sind u.a. folgende: (1) die Kopieanzahl der ribosomalen Gene 18S und 28S und damit auch der ITS-Region variiert stark zwischen verschiedenen Spezies (ROONEY UND WARD, 2005) und ist in der jeweils vorliegenden Probe in der Regel unbekannt (AMEND ET AL., 2010A). So variieren die rDNA Kopieanzahlen bei *Saccharomyces cerevisiae* von 54 bis 511 (LITI ET AL., 2009). (2) Die Schritte der Probenvorbereitung im Vorfeld der Sequenzierung – PCR-Barcode-Markierung mittels sehr langer Primerpaare und Durchführung einer zusätzlichen (Emulsions-) PCR – sowie systematische Fehler in der Identifikation der eingebauten Base in die DNA-Sequenz, verschieben die Verhältnisse der einzelnen Spezies zueinander (HUSE ET AL., 2007; QUINLAN ET AL., 2008; ROZERA ET AL., 2009; KUNIN ET AL., 2009). Bei der Verwendung von universellen Primern wird die relative Lesehäufigkeit einer individuellen Spezies jeweils durch andere Spezies im Probengemisch beeinflusst. Zudem verringern hochkonzentriert vorliegende Taxa und solche mit hoher Affinität zu den Capture Beads diese Lesehäufigkeit anderer Taxa (AMEND ET AL., 2010A). Somit bleibt eine Anwendung der Parallelsequenzierung für quantitative oder semi-quantitative Aussagen bezüglich einer mikrobiellen Gemeinschaft unklar. Studien zeigten, dass die detektierte Sequenzhäufigkeit deutlich zwischen verschiedenen Spezies variierte, obwohl diese in gleicher Quantität eingesetzt wurden (AMEND ET AL., 2010A). Außerdem zeigten Vergleiche mit qPCR-Analysen, dass viele Spezies in der Probe nicht in der Sequenzierbibliothek vertreten waren und dies v.a. diejenigen mit geringerer Konzentration betraf, während die dominanten Spezies immer detektiert werden konnten (PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012). Dennoch ist die 454 Pyrosequenzierung für die Untersuchung und zur Abbildung der Pilzdiversität in verschiedensten Proben geeignet. Zur Identifizierung spezifischer Pilzspezies für eine bestimmte Vermutung oder Tatsache sollte jedoch überlegt werden, die sensitivere, quantitative MSQPCR-Analyse alleine oder in Kombination einzusetzen (PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012).

Dies bedeutet für die vorliegende Studie, dass eine Beurteilung über die häufigsten Vertreter in den Stall- und Hausstaubproben grundsätzlich möglich ist und diese, durch die Übereinstimmung mit der PCR-SSCP-Analyse, durchaus an Qualität gewann. Diese Analyse basierte jedoch rein auf der Diversität innerhalb einer Probe, d.h. die Anzahl an Spezies in einem bestimmten Umfeld (alpha-Diversität; WHITTAKER, 1972). Auch die epidemiologische Untersuchung der Matratzenstaubproben im Rahmen der GABRIEL-Studie (GENUNEIT ET AL., 2011) hinsichtlich bestimmter Asthma-assoziativer Sequenzen/OTUs (s. Punkt 5.3.2) sollte durch die bestehende Unsicherheit der Diversitätsabbildung mittels Next Generation Sequencing nur bedingt beeinflusst gewesen sein. Im Zuge der Datenauswertung der PCR-SSCP-Analyse und der Parallelsequenzierung der Staub-komplett-Proben wurde eine gewichtete, logarithmische Regression der Daten und eine Adjustierung bezüglich Bauernhof vorgenommen. Die Daten wurden daher einer beta-Diversitätsanalyse (WHITTAKER, 1972) unterzogen, bei der Gruppierungen in Bauern und Nicht-Bauern vorgenommen sowie signifikante Unterschiede zwischen Asthmatikern und Nicht-Asthmatikern identifiziert wurden. LOZUPONE ET AL. (2007) postulierten, dass die gewichtete Analyse für große Probensammlungen mit vielen Daten aus Gemeinschaftsanalysen gut geeignet sei, sodass die Auswahl der statistischen Methoden für die vorliegende Studie als ausreichend zu beurteilen ist.

5.3 Molekularepidemiologische Untersuchungen zur Feststellung von Assoziationen zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko bei Schulkindern (GABRIEL)

844 Matratzenstaubproben von Schulkindern aus Bayern, Deutschland, die an der europaweiten GABRIEL-Studie (GENUNEIT ET AL., 2011) zur Identifikation der genetischen und umweltbeeinflussten Ursachen für Asthma teilnahmen, wurden unter epidemiologischen Gesichtspunkten mittels PCR-SSCP untersucht und signifikante Pilzspezies anhand ihrer Bandenposition im Polyacrylamidgel hinsichtlich einer Assoziation zu allergischem Asthma mit Hilfe der Sanger- und Parallelesequenzierung identifiziert. Die vorliegende Studie beschäftigte sich als erste mit dieser Thematik unter Verwendung eines kulturunabhängigen Verfahrens mit (Schimmel-) Pilzen. Ferner wurde bei 60 Proben in einer Pilotstudie mit Parallelesequenzierung die Diversität an Pilzen je Probengruppe (Asthmatiker versus Nicht-Asthmatiker sowie Bauer versus Nicht-Bauer) bestimmt und versucht, auch mit den Daten aus der Parallelesequenzierung, einen epidemiologischen Vergleich hinsichtlich Asthma anzustellen.

Die Untersuchung der umweltbeeinflussten Exposition gegenüber Mikroorganismen ist gerade in Bezug auf mögliche Auswirkungen auf die Gesundheit von großem Interesse (DOUWES ET AL., 2003). Die bisherige Diskussion führte jedoch zu kontroversen Ergebnissen. Einerseits sind mikrobielle Komponenten, wie bakterielle Endotoxine sowie Exopolysaccharide (EPS) und Mykotoxine, positiv mit Erkrankungen des respiratorischen Systems wie allergischem Asthma und COPD assoziiert (DAY UND ELLIS, 2001; LINNACKER UND SMEDLEY, 2001; RADON ET AL., 2004; SINGH UND SCHWARTZ, 2005; RADON ET AL., 2006; PEKKANEN ET AL., 2007). Auf der anderen Seite zeigten kulturelle Detektionsverfahren einen möglicherweise protektiven Effekt der mikrobiellen Exposition gegenüber allergischem Asthma und Atopie im frühkindlichen Alter (RIEDLER ET AL., 2001; VON MUTIUS ET AL., 2001; BRAUN-FAHRLÄNDER ET AL., 2002; BRAUN-FAHRLÄNDER UND LAUENER, 2003; KABESCH UND LAUENER, 2004; VAN STRIEN ET AL., 2004; EGE ET AL., 2006; PERKIN UND STRACHAN, 2006; DEBARRY ET AL., 2007; VOGEL ET AL., 2008; EGE ET AL., 2011). Dieser Effekt scheint während der Entwicklung des Immunsystems einzutreten (BRAUN-FAHRLÄNDER ET AL., 2002) und sogar bis ins Erwachsenenalter anzuhalten (LEYNAERT ET AL., 2006; RADON ET AL., 2006). Allerdings zeigte sich auch schon der pränatale Kontakt während der Schwangerschaft als unterstützend für diesen Effekt (EGE ET AL., 2006). Bezüglich der Pilze könnten hierfür

v.a. die Exopolysaccharide verantwortlich sein (SCHRAM-BIJKERK ET AL., 2005; EGE ET AL., 2007).

Bisherige Studien konzentrierten sich hauptsächlich auf die Suche nach bakteriellen Kandidaten für einen potenziell Asthma-protectiven Effekt. Als mögliche Vertreter wurden zunächst *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus licheniformis* und *Lactococcus lactis* (DEBARRY ET AL., 2007; VOGEL ET AL., 2008; KORTHALS, 2008B) erkannt. Weitere Studien identifizierten später zudem *Staphylococcus sciuri* und verschiedene *Jeotgalicoccus* spp. sowie *Macrocococcus brunensis*, *Duganella* spp., *Moraxella* spp., *Corynebacterium* spp. und *Zooglea* spp. (EGE ET AL., 2012; ZHAO, 2012).

Im Rahmen der GABRIEL-Studie (GENUNEIT ET AL., 2011) wurde die Bandbreite nun auf Pilze erweitert. Bei der kulturellen Untersuchung und epidemiologischen Auswertung wurden *Eurotium* spp. und *Penicillium* spp. als stark invers assoziiert mit allergischem Asthma identifiziert (EGE ET AL., 2011). Mit der hier beschriebenen Studie wurde nun versucht, das Spektrum an möglichen Pilzkandidaten mit kulturunabhängigen Bestimmungen wie PCR-SSCP und Parallelsequenzierung zu erweitern, eine genauere Aussage hinsichtlich der verantwortlichen Spezies zu ermöglichen sowie die Ergebnisse der kulturellen Detektion zu überprüfen.

5.3.1 PCR-SSCP-Analyse und Sequenzierung

Im Umgang mit den Matratzenstaubproben wurde darauf geachtet, die Zyklen des Auftauens und Einfrierens zu minimieren, um Schädigungen der darin enthaltenen DNA der Pilzsporen zu vermeiden. Der Matratzenstaub bestand aus losem, körnigem Staub sowie aggregierten, mit Haaren durchzogenen Staubklumpen. Zur Gewährleistung einer homogenen Aufteilung der Staubproben auf die einzelnen Aliquots wurde der Staub mittels einer DNA-freien Schere, zur Verkürzung der Haarlänge, und eines DNA-freien Spatels gleichmäßig vermischt.

Die PCR-SSCP-Analyse wurde nach dem evaluierten Standardprotokoll durchgeführt. Die resultierenden 54 Polyacrylamidgele wurden mit Hilfe der Software Gel-Compar[®] II analysiert. Teilweise konnten Gele nicht ausgewertet werden, da eine Normalisierung anhand des Speziesstandards, aufgrund zu starker Abweichungen bezüglich der Laufweite, nicht möglich war. In diesem Fall wurden die Gele komplett wiederholt. Zudem zeigte sich im Zuge der Gelnormalisierung, dass es, durch die Anpassung der Standardbanden zueinander, zu Komprimierungen bzw. Verzerrungen der Probenprofile gekommen war. Dadurch waren im Anschluss Banden, die

zuvor augenscheinlich ein und dieselbe Laufweite aufwiesen, nun nicht mehr auf einer Höhe zu bestimmen. Dies wurde auch schon im Laufe der Evaluierung der Reproduzierbarkeit der Methode ersichtlich (s.a. Punkt 5.1.3), zeigte sich bei der Auswertung dieser großen Probensammlung allerdings noch stärker. Generell hatte dies keine Auswirkung auf die Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methode, stellte aber einen zu beachtenden Faktor bei der Auswahl der zu sequenzierenden Banden dar. Auch bei der Bandmatching-Analyse durch die Software musste dies beobachtet werden. So wurden Banden teilweise fehlklassifiziert, indem sie einer anderen als der nächstliegenden Bandenklasse zugeordnet wurden. Aus diesem Grund wurden nur solche Banden für die Bestimmung mittels Sanger-Sequenzierung ausgewählt, die exakt auf Höhe der ermittelten Bandenklasse lagen. Dadurch zeigte sich, dass die Auswertung der Bandeninformationen über die Dichtewerte die robustere zu sein schien. Die Färbeintensität der Gele könnte hierbei eine Rolle gespielt haben. Je dunkler das Gel, desto höher der detektierbare Hintergrund durch die Software und desto schwieriger eine automatische Identifizierung der einzelnen Banden. Eine einheitliche Färbeintensität mit gleichbleibender Färbezeit (BASSAM ET AL., 1991) wurde versucht einzuhalten, war jedoch nicht in allen Fällen möglich. Teilweise waren nach der gegebenen Zeit noch keine Banden zu erkennen, sodass die Inkubation mit der Entwicklerlösung verlängert wurde. Oder die Färbung war bereits vor Ablauf der Zeit sehr intensiv, woraufhin die Zeit verkürzt wurde. Diese Problematik wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die statistische Analyse der 844 Bandenprofile erfolgte mit Hilfe zweier unterschiedlicher Ansätze bei denen jeweils die relative Laufweite einzelner Banden im Polyacrylamidgel (Gelposition) berücksichtigt wurde. Bei der densitometrischen Auswertung wurden die einzelnen Positionen kontinuierlich vom Gelstart bis zum Gelende durchnummeriert und als ganze Zahl ausgegeben. Mit Hilfe der Bandmatching-Anwendung der GelCompar[®] II Software wurden die einzelnen Banden automatisch klassifiziert und diese Bandenklassen in Abhängigkeit der prozentualen Laufweite im Gel (0 %: Gelstart; 100 % Gelende) angegeben. Dabei ergaben sich in Bezug auf allergisches Asthma fünf signifikant invers assoziierte Gelpositionen (621/627, 1132, 34,7 %, 42,9 %, 77,2 %) und zwei positiv assoziierte Gelpositionen (1410, 53,0 %). Weitere signifikante Gelpositionen waren bei der densitometrischen Auswertung vorhanden, wurden jedoch zunächst ausgeschlossen, da nur Schnittmengen aus den drei Analysevarianten mit kontinuierlicher Verwendung der

logarithmierten Werte sowie Cut-off 5 und 10 arbiträren Einheiten der dichotomisier-ten Variablen zur Erhöhung der Robustheit analysiert wurden. Eine Übereinstimmung hinsichtlich der Lage der signifikanten, mit Asthma assoziierten Banden im PCR-SSCP-Profil zwischen der densitometrischen Auswertung und der Bandmatching-Analyse ergab sich leider nicht, weshalb die Ergebnisse getrennt voneinander be-trachtet werden mussten. Die isolierten Sequenzen aus 32 Banden der signifikanten Gelpositionen (PETERS ET AL., 2000) wurden mittels Sanger-Sequenzierung und 454 Parallelsequenzierung untersucht. Eine Übereinstimmung hinsichtlich der detektier-ten Hauptsequenz zwischen beiden Verfahren von 75 % (21 von 28) konnte festge-stellt werden. Durch den parallelen Ansatz der Pyrosequenzierung war es zudem möglich, die vier zuvor, aufgrund zu hoher Sequenzheterogenität, nicht-editierbaren Proben näher zu bestimmen. Damit lässt dieses neue Verfahren eine spezifischere Aussage bei der Sequenzierung zu (SOGIN ET AL., 2006; s.a. Punkt 5.2.3). Die Möglichkeit, eine quantitative Aussage über die Lesehäufigkeit einer Sequenz ge-genüber weiteren Sequenzen in einer Probe zu treffen, steht jedoch momentan in wissenschaftlichem Diskurs (s.a. Punkt 5.2.3; AMEND ET AL., 2010A).

Im Folgenden soll nun eine Plausibilitätsprüfung der erhaltenen Sequenzierergeb-nisse anhand vorhandener Literatur angestellt werden.

Eine Sequenz wurde in allen 32 untersuchten Proben gefunden. Hierbei handelte es sich um den Pilz *Epicoccum nigrum*, welcher auch schon zuvor als ubiquitär vor-kommend beschrieben wurde (MEYER ET AL., 1983; LEWIS ET AL., 1991; AMEND ET AL., 2010B). Zusammen mit den Genera *Cladosporium* und *Alternaria* macht er ca. 90 % der Sporen in der Außenluft aus (LACEY, 1996). *E. nigrum* ist als Allergen-Produzent und Induktor von IgE-vermittelter Allergie beschrieben (DIXIT ET AL., 1992; BLACK ET AL., 2000; DAY UND ELLIS, 2001), zeigte hier jedoch keine Gruppenzugehörigkeit be-züglich Asthma-Induktion oder -Protektion.

Übereinstimmend mit EGE ET AL. (2011) konnten auch in der vorliegenden Studie *Penicillium* spp. als invers assoziiert mit Asthma beschrieben werden. Zu den primär detektieren Spezies dieser Gruppe gehörten *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. lanosum*, *P. nalgiovense* und *P. spinulosum*. So konnte eine etwas spezifischere Aussage gegenüber den zuvor durchgeführten kulturellen Versuchen getroffen werden (EGE ET AL., 2011). *Eurotium* spp., als weitere in der zuvor genann-ten Studie gefundene Kandidaten für einen Asthma-protectiven Effekt, wurden bei verschiedenen Proben unterschiedlicher Gelpositionen – v.a. invers, aber auch posi-

tiv assoziiert mit Asthma – gefunden, sodass eine definitive Aussage hierüber nicht getroffen werden konnte. Hierfür müsste die Analyse auf zusätzliche signifikante Gelpositionen ausgeweitet werden. Als weitere signifikant invers assoziierte Pilzspezies wurden *Exophiala* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Glyphium elatum*, *Phialophora europaea*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Septoria lycopersici* und *Wallemia muriae* identifiziert.

Asthma-induzierend schienen v.a. *Didymella exitialis* und *Sydowia polyspora/Rhizosphaera kalkhoffii* sowie *Saccharicola bicolor* und *Pseudotaeniolina globosa* zu wirken.

Positiv assoziierte Gelpositionen und Pilzspezies

Beginnend mit den positiv assoziierten Spezies der Gelposition 1410, wurde *Didymella exitialis* ursprünglich als Pflanzenpathogen des Weizens und der Gerste beschrieben (PUNITHALINGAM, 1979; CROMEY ET AL., 1994) und kann einen Ernteverlust von bis zu 15 % durch Befall der Blätter verursachen (PAUL, 1983). Weitere wichtige Weizenpathogene, die hier genannt werden müssen, sind u.a. *Cladosporium herbarum* und *Alternaria alternata*. Die Sporenkonzentrationen aller drei Pilzspezies erreichen ihre Höchstwerte während der Erntezeit im August, wobei diejenigen von *Cl. herbarum* und *Al. alternata* vorwiegend an trockenen Tagen und die von *D. exitialis* erst direkt nach einem Regenschauer zu finden sind. In einer Fallstudie zeigte sich jedoch zum ersten Mal auch ein allergenes Potenzial von *D. exitialis* in Verbindung mit Spätsommer-Asthma und eine enge Verwandtschaft mit den Allergenen von *Al. alternata* (HARRIES ET AL., 2004). Bei beiden Spezies tritt die spezifische Bildung von IgE-Antikörpern auf (DAY AND ELLIS, 2001). *Al. alternata* ist zudem als stark Asthma-induzierend beschrieben (DOWNS ET AL., 2001). Durch den Befall von Weizen und Gerste kann zudem ein Transfer in den Matratzenstaub als möglich angesehen werden.

Saccharicola bicolor ist eine neue Spezies (ERIKSSON UND HAWKSWORTH, 2003). Sie ging aus *Leptosphaeria bicolor* hervor und weist Ähnlichkeiten mit den Genera *Massarina* und *Lophiostoma* auf. Beschrieben ist sie als Schädling des Zuckerrohrs. Bezüglich des Vorkommens in Stall- und Hausstaub sowie gesundheitlicher Effekten ist noch nichts bekannt.

Pseudotaeniolina globosa war das Ergebnis einer Einzelprobe von Gelposition 1410 bei der Sanger-Sequenzierung. Im Zuge der Parallelsequenzierung zeigte sich, dass *Ps. globosa* in vielen Proben, sowohl positiv als auch invers assoziiert mit Asthma, vorkam, sodass die Einschätzung als möglicher Asthma-induzierender Kandidat fraglich erscheint. Literatur zur dieser Pilzspezies ist rar. Isoliert wurde diese Spezies bisher nur aus Festgestein in Italien, Holz und bei einer Autopsie einer menschlichen Aorta nach einem tödlichen Aneurysma (DE LEO ET AL., 2003).

Die Ergebnisse für *Didymella exitialis*, *Saccharicola bicolor* und *Pseudotaeniolina globosa* stammten alle von Gelposition 1410. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und der Einschätzung der Literaturstellen sollte *D. exitialis* für diese Gelposition als Hauptvertreter hinsichtlich einer potenziell Asthma-induzierenden Wirkung angesehen werden.

Die Sanger- und Parallelsequenzierung der positiv assoziierten Gelposition 53,0 % lieferte je nach Datenbank einen anderen Treffer mit der höchsten Wahrscheinlichkeit, wobei die zweite Spezies direkt dahinter folgte. Bei NCBI-BLAST war es *Rhizosphaeria kalkhoffii*, bei CBS-KNAW *Sydowia polyspora*. Beide Pilzspezies sind als Nadelschädlinge von Fichte und Tanne in der Literatur zu finden (RACK UND BUTIN, 1984; BUTIN UND WAGNER, 1985; TALGO ET AL., 2010). *Sy. polyspora* wurde zudem auch in Hausstaubproben nachgewiesen (RINTALA ET AL., 2012) und könnte dort durch externen Eintrag von Nadeln oder über Kleidungsabrieb an den Bäumen in die Probe gelangt sein. Studien über diese beiden Spezies in Verbindung mit Auswirkungen auf das respiratorische System wurden bisher jedoch noch nicht veröffentlicht.

Invers assoziierte Gelpositionen und Pilzspezies

Die Sequenzierung der Proben von Gelposition 621/627 führte zu heterogenen Ergebnissen, wobei die Hauptvertreter *Exophiala* sp., verschiedene *Penicillium* spp. und *Aureobasidium pullulans* waren. *Glyphium elatum* (keilförmiger Kohlenpilz) und *Phialophora europaea* waren in den Ergebnissen unterrepräsentiert.

G. elatum wächst ganzjährig auf abgestorbenem, verwittertem Holz (LORENZO UND MESSUTI, 2005) und wurde nach dem Jahr 2000 taxonomisch zu den *Chaetothyriales*, einer Schwestergruppe der *Eurotiomyzeten*, hinzugefügt (LINDEMUTH ET AL., 2001).

Ph. europaea zeigt eine morphologische Ähnlichkeit mit den schwarzen Hefe-ähnlichen Pilzen wie *Exophiala* spp. (ZENG ET AL., 2007) und ist als Haut- und Nagelpilz beschrieben (DE HOOG ET AL., 2005; SAUNTE ET AL., 2012). Andere *Phialophora* spp. wie *Ph. radiciola* wurden bereits in Matratzenstaub gefunden (BEGUIN, 1985); *Ph. europaea* jedoch noch nicht.

Die Gattung *Exophiala* gehört zur Familie der *Herpotrichiellaceae* und wird durch ihre Melaninproduktion zu den schwarzen Hefen oder den schwarze-Hefen-ähnlichen Pilzen gezählt (FLANNIGAN UND MILLER, 2001). Die Hauptvertreter dieser Gattung, *Ex. dermatitidis*, *Ex. jeanselmei* und *Ex. spinifera*, gelten als Auslöser systemischer Mykosen beim Menschen wie Chromoblastomykose und Phaeohyphomykose (MATSUMOTO, 2006; LÓPEZ MARTÍNEZ UND MÉNDEZ TOVAR , 2007; HARRIS ET AL., 2009). Im Zuge dessen wurde auch *Ex. dermatitidis* erstmals beschrieben (KABEL ET AL., 1994). *Exophiala* spp. sind, aufgrund ihrer oligotrophen Natur, ihrer geringen kompetitiven Fähigkeiten gegenüber anderen Pilzen und ihren langen Anzuchtzeiten, schwer zu isolieren (VICENTE ET AL., 2008). Des Weiteren sind sie pleomorph, d.h. sie zeigen eine morphologische Variabilität in Abhängigkeit ihrer Umwelt, und sind daher auch nur schwer zu identifizieren bzw. zu charakterisieren (UIJTHOF, 1996). So besitzt zum Beispiel *Ex. jeanselmei* vier bekannte morphologische Varianten (DE HOOG, 1997). Gefunden wurden sie bisher im Boden, in verwittertem Holz, in Badewasser, in Luftbefeuchtern (WANG ET AL., 2001), in öffentlichen Dampfbädern (MATOS ET AL., 2002) und in Leitungswasser (BIEDUNKIEWICZ UND SCHULZ, 2012). Außerdem sind sie die häufigsten Pathogene in Gummidichtungen von Geschirrspülern (GÖTTLICH ET AL., 2002; ZALAR ET AL., 2011) und Kontaminanten in Geräten zur Sammlung der Bronchioalveolären Lavage (BAL) in Krankenhäusern (SUMMERBELL, 2001). Darüber hinaus bestätigen Studien auch das Vorkommen in Haus- und Matratzenstaub (BEGUIN, 1994; BEGUIN UND NOLARD, 1996; DUCHAINE UND MÉRIAUX, 2001; ABDEL HAMEED ET AL., 2004; LUGAUSKAS ET AL., 2009) in Assoziation mit Feuchtigkeit (HYVÄRINEN ET AL., 2002). Neben dem dermatologischen Gesichtspunkt wurden *Exophiala* spp. auch mit Infektionen der Lunge in Verbindung gebracht (SUMMERBELL, 2001). *Ex. dermatitidis* selbst oder dagegen gerichtete Antikörper wurden dabei häufig in Sputum und Lavagen von Patienten mit zystischer Fibrose gefunden (HAASE ET AL., 1991; KUSENBACH ET AL., 1992; NAGANO ET AL., 2008; GRIFFARD ET AL., 2010). Hierbei zeigten sich deutlich erhöhte Konzentrationen an Antikörpern gegenüber dieser Spezies als bei ge-

sunden Vergleichsprobanden (CONRAD, 2001). Möglicherweise könnte jedoch auch eine Lungenkolonisation bei Personen ohne diese Erkrankung auftreten (SAMUELS, 1989). Außerdem wurde *Ex. jeanselmei* als Auslöser von Pneumonie oder der Sauna-Lunge, einer hypersensitiven Pneumonie (MANIAN UND BROSCETTO, 1993; HAUNG ET AL., 2010) sowie *Ex. oligosperma* als Auslöser von bronchialem Asthma (BADALI ET AL., 2011) beschrieben. Aufgrund des geringen Durchmessers ihrer Sporen von 1,6 µm können diese tief in die Lunge vordringen (ABDEL HAMEED ET AL., 2004). Eine genaue Aussage auf Speziesebene war in dieser Studie nicht möglich. Allerdings gelten *Ex. dermatitidis*, *Ex. jeanselmei* und *Ex. oligosperma* als die wahrscheinlichsten Kandidaten, deren Auswahl im nachfolgenden Schritt im Tierexperiment überprüft werden sollte. Die schwierige Isolierung dieser Spezies über kulturelle Verfahren könnte zudem das Nicht-Auffinden in der vorherigen Studie begründen (EGE ET AL., 2011) und verdeutlicht die Notwendigkeit des zusätzlichen Einsatzes kulturunabhängiger Verfahren zur Bestimmung der Pilzdiversität.

Das Genus *Penicillium* gehört, zusammen mit *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus* spp. und *Leptosphaeria* spp., zu den häufigsten Pilzgenera in der Außen- und Innenraumlufte (LI UND HSU, 1997; MULLINS, 2001; FLANNIGAN, 2001). Während *Aspergillus* und *Penicillium* in der Außenluft hierbei 2-10 % der Sporen ausmachen (LACEY, 1996), sind sie in der Innenraumlufte bzw. in abgelagertem Staub sowie in der Matratze in der Regel die häufigsten Vertreter (BEGUIN, 1994; BEGUIN UND NOLARD, 1996; KAARAKAINEN ET AL., 2009; PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012; RINTALA ET AL., 2012) und die Konzentration unterliegt keiner saisonalen Schwankung (ANDERSON, 1985). *Penicillium* spp. werden häufig in Verbindung mit Feuchtigkeit im Haus genannt (GRANT ET AL., 1989; GRAVESEN ET AL., 1997; HYVÄRINEN ET AL., 2002; LIGNELL ET AL., 2008) und kommen dabei in Häusern von Asthmatikern in bis zu 40-fach höherer Konzentration gegenüber der Außenluft vor (SENKPIEL ET AL., 1996). Zudem können sie atopisches Asthma induzieren (LICORISH ET AL., 1985). Außerdem waren sie bei den häufigsten Pilzen in diversen Stallstaubproben zu finden (KARWOWSKA, 2005); ein möglicher Transfer vom Stall in die Matratze konnte nachgewiesen werden (VOGEL ET AL., 2008). Sie sind als Auslöser IgE-vermittelter Allergien, wie allergischem Asthma, bekannt (SHEN ET AL., 1999; DAY UND ELLIS, 2001). Elf Allergene wurden bisher identifiziert, wobei ein 68 kDa Protein hierbei zunächst als wichtigstes angesehen wurde (SHEN ET AL.,

1995). Später zeigten 80-93 % asthmatischer Patienten eine IgE-Reaktivität gegenüber den 32 bis 34 kDa Serinproteasen u.a. von *P. brevicompactum* und *P. chrysogenum* (SHEN ET AL., 1999). Außerdem produzieren *Penicillium* spp. verschiedenste Mykotoxine wie z.B. Ochratoxin, Mykophenolsäure, Brevanamide, Roquefortine, Chrysogine und Cyclopiazonsäure (FISCHER UND DOTTS, 2003; JARVIS UND MILLER, 2004). Da ihre Sporen einen Durchmesser von weniger als 5 µm aufweisen (ABDEL HAMEED ET AL., 2004), können diese tief in die Lunge vordringen und so sowohl im Sputum als auch in der Lavage in hoher Anzahl nachgewiesen werden (MULLINS UND SEATON, 1978). Da über 570 verschiedene Subspezies und intraspezifische Varianten bekannt sind (PITT ET AL., 2000), ist eine speziesbezogene Aussage für weitere Untersuchungen hinsichtlich eines möglicherweise Asthma- protektiven Effekts essentiell. Bei kulturellen Verfahren war dies zuvor nicht möglich (EGE ET AL., 2011). In der vorliegenden Studie konnten jedoch sechs *Penicillium* spp. mit der Gelposition 621/627 in Verbindung gebracht werden. Inverse Assoziationen bezüglich der Prävalenz von allergischem Asthma wurden bisher in keinem Fall beschrieben.

P. brevicompactum wird relativ häufig in abgelagertem Staub und in Matratzen detektiert (BEGUIN, 1994; FLANNIGAN UND MILLER, 2001). Eine Verbindung mit der Entstehung von kindlichem Asthma scheint nicht zu bestehen (REPONEN ET AL., 2012), jedoch ist eine positive Assoziation mit erwachsenen Asthmatikern sowie mit einer erhöhten Prävalenz gegenüber dem Organic Dust Toxic Syndrome (ODTS) vorhanden (FLANNIGAN, 2001; SORENSON, 2001). Zudem führte die Gabe des von *P. brevicompactum* gebildeten Toxins Brevanamid A zu starken Entzündungs- und zytotoxischen Reaktionen in Lungen von Mäusen, einhergehend mit hohen Konzentrationen an Makrophagen, Neutrophilen, Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-6 (IL-6) sowie an Laktatdehydrogenase (LDH) in der Bronchioalveolären Lavage (BAL; RAND ET AL., 2005).

P. commune ist ebenfalls häufig in Hausstaubproben zu finden (FLANNIGAN UND MILLER, 2001) und beschreibt eine Gruppe saprophytischer Pilze (u.a. Weichkäse-Schimmelpilze), die wie *P. camembertii* teilweise auch domestiziert sind (PITT ET AL., 1986). Eine Gemeinsamkeit aller von *P. commune* abgeleiteten Spezies ist die Produktion von Cyclopiazonsäure. Dieses Mykotoxin wurde bisher in Fleischproben und Käse nachgewiesen (LEISTNER UND PITT, 1977; LE BARS, 1979). Physiologisch inhibiert dieses die Ca²⁺-ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum, was zu einem er-

höhten nicht-selektiven Calcium-Ionen-Einstrom in die tracheale, glatte Muskulatur und damit zu einer Kontraktion dieser führt (HELLI ET AL., 2005). Die Kontraktion, Proliferation und Migration der glatten Muskulatur des luftleitenden Systems wurde bereits mit respiratorischen Erkrankungen wie Asthma und akutem Atemnotsyndrom in Verbindung gebracht (LI ET AL., 2003). Außerdem wurde auch bei dem eng-verwandten *P. camembertii* bereits eine Assoziation mit extrinsischer, allergischer Alveolitis festgestellt (FILIPELLO MARCHISIO ET AL., 1999).

P. chrysogenum ist die am häufigsten im Allgemeinen bzw. in Matratzenstaub im Speziellen detektierte *Penicillium* spp. (PITT, 1980; BEGUIN, 1994; FLANNIGAN UND MILLER, 2001; KOLOSSA-GEHRING ET AL., 2007). Diese Spezies wurde in dieser Studie zwar kein einziges Mal als der wahrscheinlichste Treffer durch die Datenbanken ausgegeben, war jedoch generell der häufigste Vertreter unter den 100 signifikantesten Treffern. Zahlreiche Studien beschrieben eine Assoziation mit Feuchtigkeit im Haus, erhöhten IgE-Konzentrationen und einer damit verbundenen erhöhten Prävalenz gegenüber allergischen Reaktionen (u.a. SHEN ET AL., 1999; COOLEY ET AL., 2000; SCHWAB ET AL., 2004; CHUNG ET AL., 2005; RYDJORD ET AL., 2008). Im Review von FLANNIGAN (2001) wurde zudem ein stärkeres Vorkommen in Häusern asthmatischer Kinder als bei asthmatischen Erwachsenen beschrieben. *P. chrysogenum* produziert u.a. Roquefortin C (JARVIS UND MILLER, 2004), welches zu inflammatorischen und zytotoxischen Reaktionen in Mäuselungen führte (RAND ET AL., 2005). Bisher sind fünf spezifische *P. chrysogenum* Allergene beschrieben, die alle IgE-assoziiert sind (WILSON ET AL., 2009) und teilweise Kreuzreaktivitäten mit Allergenen anderer Spezies wie *P. brevicompactum* aufwiesen (SHEN ET AL., 1996).

Eine weitere, in dieser Studie identifizierte, Spezies war *P. nalgiovense*. Diese wird als Starterkultur für die Fermentation u.a. in Salami eingesetzt (LEISTNER, 1990). Untersuchungen schlossen auf eine enge Verwandtschaft mit *P. chrysogenum*, aufgrund morphologischer Übereinstimmungen und DNA-Sequenzähnlichkeiten (SAMSON UND VAN REENEN-HOEKSTRA, 1998; GEISEN, 1995) sowie der Fähigkeit, ebenfalls Penicillin zu produzieren (ANDERSEN UND FRISVAD, 1994). GUILLOT ET AL. (2008) konnten zudem eine Verbindung mit hypersensitiver Pneumonie erkennen. *P. nalgiovense* produziert keines der bisher bekannten Mykotoxine (ANDERSEN, 1995).

P. spinulosum ist ein dominanter Vertreter in Hausstaub (BEGUIN, 1994; FLANNIGAN UND MILLER, 2001) und konnte zudem häufig in Häusern asthmatischer Kinder nach-

gewiesen werden (FLANNIGAN, 2001). Diese Spezies spielt u.a. eine Rolle bei der Verderblichkeit von Kastanien und abgefüllten Getränken (BATTEY ET AL., 2001; OVERY ET AL., 2003), aber auch beim ODTs (SORENSEN, 2001). MURTONIEMI ET AL. (2001) detektierten inflammatorische und toxische Reaktionen in Maus-Makrophagen *in vitro*; *in vivo* zeigte sich jedoch nur ein geringes Potential von *P. spinulosum*, akute respiratorische Erkrankungen herbeizuführen und es wurden keine zytotoxischen Eigenschaften registriert (JUSSILA ET AL., 2002); auch Mykotoxine sind bisher nicht beschrieben.

In der Literatur ist nur wenig über *P. lanosum* zu finden. So wurde das Vorkommen dieser Spezies bisher in verschimmeltem Getreide und einer damit verbundenen Infektion des Gastrointestinaltrakts bei Hühnern (BEASLEY ET AL., 1980) sowie in Bodenproben (FRISVAD ET AL., 2006) beschrieben. Eine Studie zeigte zudem einen Zusammenhang zwischen *P. lanosum* Exposition und Asthma bzw. vasomotorischer Rhinitis (MORROW UND LOWE, 1943).

Aureobasidium pullulans wurde in dieser Studie häufig bei der Gelposition 621/627 und mit Hilfe der Parallelsequenzierung auch bei der Gelposition 34,7 % (hier jedoch nicht dominant) nachgewiesen und zählt, ebenso wie *Exophiala*, aufgrund seiner Melanin-Produktion zu den sogenannten „schwarzen Hefen“ (CHI ET AL., 2009). Diese Spezies gilt als ubiquitär vorkommend und wurde bereits aus Bodenproben, Pflanzen, Holz, feuchten Hausoberflächen und der Innenraumluft isoliert (BEGUIN UND NOLARD, 1996; FLANNIGAN UND MILLER, 2001; HAWKES ET AL., 2005; PRASONGSUK ET AL., 2005; LUGAUSKAS ET AL., 2009; JOSHI ET AL., 2010) und als dominant in Matratzenstaubproben detektiert (BEGUIN, 1994; WOODCOCK ET AL., 2006). Bekannt ist sie hauptsächlich in der biotechnologischen Anwendung zur Produktion von Pullulan, EPS, Einzelzellproteinen und hydrolytischen Enzymen (CHI ET AL., 2009), gilt aber auch als opportunistisches Humanpathogen u.a. bei der Entstehung von Milzabszessen, Fungämie, Rhinitis und Asthma (SALKIN ET AL., 1986; HAWKES ET AL., 2005; STARK ET AL., 2005; NIEDOSZYTKO ET AL., 2007) und wurde in geringem Umfang im Sputum nachgewiesen (MULLINS UND SEATON, 1978). Eine Assoziation mit Kindheitsasthma scheint jedoch nicht zu bestehen (REPONEN ET AL., 2012). Die Sporengröße liegt bei $> 5 \mu\text{m}$, sodass eine tiefliegende Penetration der Lunge als fraglich gilt (ABDEL HAMEED ET AL., 2004). Dennoch könnte das Ergebnis, *Au. pullulans* als möglichen protektiven Kandidaten identifiziert zu haben, als plausibel erachtet werden.

Die folgenden drei Pilzspezies wurden als dominante Vertreter bei den invers assoziierten Gelpositionen 34,7 %, 42,9 % und 77,2 % nach der Bandmatching-Analyse identifiziert:

Leptosphaerulina chartarum (teleomorph: *Pithomyces chartarum*, ROUX, 1986) gilt als Weizenpathogen (TÓTH ET AL., 2007). Während im Review von FLANNIGAN UND MILLER (2001) das Vorkommen in Hausstaub generell als gering eingestuft wurde, erwies sich *L. chartarum* in finnischen Häusern auf dem Land (PITKÄRANTA ET AL., 2008 UND 2011) sowie in New York City (GREEN ET AL., 2009) als häufig vorkommend. Auch in Matratzenstaub erfolgte der Nachweis (WOODCOCK ET AL., 2006). Eine Assoziation hinsichtlich respiratorischer Erkrankungen wurde bisher nicht postuliert; eine Verbindung mit der Auslösung IgE-vermittelter Allergien scheint jedoch gegeben (DAY UND ELLIS, 2001).

Septoria lycopersici bewirkt die Blattfleckenkrankheit bei der Tomatenpflanze (MACNEILL, 2011). Ein Nachweis in Stall- oder Hausstaubproben oder auch ein Zusammenhang mit Krankheiten der Lunge konnte bisher nicht erbracht werden.

Das Genus *Wallemia* teilt sich in drei Spezies auf (*W. sebi*, *W. muriae* und *W. ichthyophaga*), wobei die ersten beiden eng miteinander verwandt zu sein scheinen, während sich letztere von den anderen phylogenetisch deutlich separiert (ZALAR ET AL., 2005). Isoliert werden konnte *Wallemia* bisher von süßen, salzigen und trockenen Nahrungsmitteln (SAMSON ET AL., 2002), aus dem Boden (DOMSCH ET AL., 1980), aus Innenraum- und Außenluft (TAKAHASHI, 1997), aus Heu und Silage (REBOUX ET AL., 2006) und aus Matratzenstaubproben (BEGUIN, 1994). Zudem ist für das Vorkommen in Matratzenstaub ein Transfer aus dem Stall nachgewiesen (VOGEL ET AL., 2008). *Wallemia* spp. produzieren die Mykotoxine Walleminol und Walleminon (JARVIS UND MILLER, 2004), die mit dem Krankheitsbild der Farmerlunge in Verbindung gebracht werden (REBOUX ET AL., 2001; ROUSSEL ET AL., 2004). Zudem zeigte sich bei Asthmatikern, die in Häusern mit Wasserschaden leben, eine stärkere Exposition (VESPER ET AL., 2006). Allerdings basierten diese Berichte bisher auf dem Nachweis auf Genusebene im Generellen oder in Bezug auf *W. sebi* im Speziellen. Über *W. muriae* ist bisher wenig bekannt und beschrieben. Diese Spezies wurde jedoch in dieser Studie beim Abgleich der Sequenzen in den Datenbanken als die wahrscheinlichste ausgegeben. Die Treffer für *W. sebi* folgten erst später. Die

Sequenzen zeigten eine 97%ige Übereinstimmung mit dem gewählten DSMZ-Referenzstamm *W. sebi* (DSM 5329), sodass die enge Verwandtschaft beider Spezies noch einmal aufgezeigt wurde, allerdings *W. muriae* als die wahrscheinlichere Spezies für einen potenziell Asthma-protektiven Effekt angesehen werden muss.

5.3.2 Parallelsequenzierung von Matratzenstaubproben zur Ermittlung der Diversität und der Assoziation spezifischer Sequenzen bezüglich Asthma

60 Matratzenstaubproben wurden während dieser Pilotstudie für die Diversitätsanalyse und die Bestimmung von Assoziationen bezüglich allergischen Asthmas herangezogen. Aufgrund der geringen Probenanzahl war daher eine endgültige Beurteilung der Pilzexposition von Schulkindern unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlichem, gesundheitlichem Hintergrund sowie ein Vergleich mit der oben genannten PCR-SSCP-Analyse von insgesamt 844 Proben nicht möglich. Zudem waren zum Teil hohe Unterschiede in der Anzahl an Sequenzen im Vergleich der Proben zu erkennen. Die Aussagen bezüglich der Pilzdiversität bezogen sich rein auf die relative Häufigkeit einer OTU-Sequenz in einer Probe, mit vergleichender Auswertung der häufigsten OTUs. Zusätzliche Detektionen einzelner Pilzspezies in weiteren OTUs wurden nicht mit eingerechnet. Für die biostatistische Bestimmung signifikant mit Asthma assoziierter Sequenzen wurde jedoch der Faktor der Varianz der Anzahl an Sequenzen mit einbezogen.

Dennoch konnte eine erste Aussage über die Pilzdiversität in Matratzenstaubproben von Schulkindern in Bayern, Deutschland, getroffen werden. Das Auffinden der häufigsten Spezies wie *Epicoccum nigrum*, *Cryptococcus* spp., *Eurotium repens*, *Pichia fermentans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Leptosphaerulina* spp., *Debaromyces hansenii*, *Aureobasidium pullulans* und *Phoma herbarum* usw. stand im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls Hausstaubproben untersuchten (BEGUIN, 1995; BEGUIN UND NOLARD, 1996; FLANNIGAN UND MILLER, 2001; KAARAKAINEN ET AL., 2009; PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012). *E. nigrum* war die dominante Sequenz in allen Proben. Das starke Vorkommen des ubiquitär vorkommenden Pilzes (MEYER ET AL., 1983; LEWIS ET AL., 1991; AMEND ET AL., 2010B) zeigte sich auch in dieser Studie bereits bei der Parallelsequenzierung mit Asthma assoziierter Gelpositionen der PCR-SSCP-Analyse sowie bei der Bestimmung der Pilzdiversität in Stall-

und Hausstaubproben. Allerdings ist eine definitive Aussage über die „wirkliche“ Zusammensetzung einer Pilzgemeinschaft, v.a. hinsichtlich einer quantitativen Aussage, mittels der Parallelsequenzierung schwierig zu beurteilen und wurde bereits vorab diskutiert (s. Punkt 5.2.3; AMEND ET AL., 2010A). So könnte das häufige Vorkommen auch an einer im Vergleich höheren Affinität der *E. nigrum*-Sequenz zu den Capture Beads liegen. Verwunderlich war zudem das nahezu vollständige Fehlen von *Penicillium* und *Aspergillus* Spezies in dem Gemisch an Sequenzen dieser Studie. Lediglich zwei Vertreter der *Aspergillus glaucus* Gruppe – *Eu. repens* und *Eu. amstelodami* – waren unter den dominanten Vertretern identifizierbar. Aufgrund dessen, dass diese beiden Genera, wie bereits zuvor erwähnt, in der Innenraumluft und in abgelagertem Hausstaub am häufigsten vorkommen und auch mittels Parallelsequenzierung detektiert werden konnten (BEGUIN, 1995; BEGUIN UND NOLARD, 1996; KAARAKAINEN ET AL., 2009; PITKÄRANTA ET AL., 2011; NONNENMANN ET AL., 2012; RINTALA ET AL., 2012), war dies nicht nachvollziehbar. Eine Vermutung war zunächst ein sogenanntes „Verstecktsein“ der Sequenzinformationen dieser beiden Genera in den häufigsten OTUs mit einer anderen repräsentativ ausgewählten OTU-Sequenz. Ein Abgleich von ITS-Referenzsequenzen von *P. chrysogenum* und *A. versicolor* mit den Sequenzen der am häufigsten gefundenen Spezies zeigte jedoch keine Übereinstimmung mit taxonomischer Relevanz. Eine generelle Identifikation von *Penicillium* und *Aspergillus* mit der hier vorgestellten Methode war jedoch prinzipiell möglich, wie an der Untersuchung der ausgeschnittenen Banden der PCR-SSCP-Analyse sowie am Auffinden der teleomorphen Stadien (*Eurotium* spp.) ersichtlich war. Da zudem die Vorbereitung für alle Proben identisch war, könnte eine weitere Ursache ein systematischer Fehler in der Identifikation der eingebauten Base in die DNA-Sequenz gewesen sein (HUSE ET AL., 2007; QUINLAN ET AL., 2008; ROZERA ET AL., 2009; KUNIN ET AL., 2009), sodass aufgrund dieser Sequenzierfehler eine Unterrepräsentierung oder Fehlidentifizierung der *Penicillium* und *Aspergillus* Sequenzen vorlag. Außerdem wurden in den vorgenannten Diversitätsstudien andere Primerpaare als hier verwendet. Geklärt werden sollte daher, ob die ITS1/ITS4-Sequenzen von *Penicillium* und *Aspergillus* eine niedrigere Affinität zu den Capture Beads aufweisen als diejenigen von anderen Spezies (s.a. AMEND ET AL., 2010A). Deshalb sollte dieser Sachverhalt in folgenden Versuchen weiter untersucht werden.

Bei der Betrachtung der häufigsten OTU-Sequenzen zeigten sich Unterschiede zwischen Bauern und Nichtbauern sowie im Vergleich von Asthmatikern und solchen Kindern ohne Asthma.

Die bei den Nichtbauern im Verhältnis häufiger vorkommenden Spezies *Alternaria alternata* und *Aureobasidium pullulans* sind ubiquitär vorkommend (BEGUIN UND NOLARD, 1996; LI UND HSU, 1997; FLANNIGAN UND MILLER, 2001; HAWKES ET AL., 2005; PRASONGSUK ET AL., 2005; LUGAUSKAS ET AL., 2009; JOSHI ET AL., 2010) und daher auch bei den nichtbäuerlichen, aber im ländlichen Umfeld aufwachsenden Schulkindern zu erwarten. Und auch *Leptosphaerulina chartarum* wurde schon in Hausstaubproben auf dem Land nachgewiesen (PITKÄRANTA ET AL., 2008 UND 2011). Gleiches könnte daher auch für den ebenfalls als Grasschädling (MITKOWSKI UND BROWNING, 2004) bekannten Pilz *L. australis* gelten.

Dagegen zeigte sich bei Betrachtung der OTUs, dass fünf Spezies häufiger in den Matratzen der Bauernkinder gefunden werden konnten. *Eurotium* spp., *Cladosporium* spp. und *Wallemia sebi* sind oft in Heu und Silage bzw. im Kuhstall nachweisbar (MULINGE UND APINIS, 1969; REBOUX ET AL., 2001; KARWOWSKA, 2005; REBOUX ET AL., 2006; LUGAUSKAS ET AL., 2009) und bei letzteren beiden wurde der Transfer hiervon in Matratzen von Kindern bestätigt (VOGEL ET AL., 2008). In der oben diskutierten Untersuchung der Pilzdiversität im Kuhstall (s. Punkt 5.2.2) waren zudem auch hier *Cladosporium* spp. die dominanten Vertreter.

Die vakuoläre Serinprotease ist das bedeutendste Allergen von *Cladosporium cladosporioides* und spezifische Antikörper wurden in Seren von asthmatischen Patienten gefunden (CHOU ET AL., 2008), sodass auch hier eine möglicherweise positive Assoziation bezüglich der Entstehung von allergischem Asthma besteht.

Pichia fermentans ist mit der Herstellung von Wein und Milchprodukten assoziiert (GUILLAMÓN ET AL., 1998; LOPANDIC ET AL., 2006) und ist zudem Bestandteil der Weizenflora (KURTZMAN ET AL., 1970). Außerdem scheint diese Spezies mitunter die häufigste Hefe in Silage zu sein (MIDDELHOVEN UND FRANZEN, 1986; O'BRIEN ET AL., 2007). Ebenso wie *Pi. fermentans* findet sich *Trichosporon cutaneum* in Milchprodukten und tritt hierbei als Verderbserreger auf, der auch bereits auf dem Bauernhof in die Milch gelangt sein kann (O'BRIEN ET AL., 2007). Diese Hefe ist in seltenen Fällen bei der Entstehung der Hefemastitis bei Rindern beteiligt (KRUKOWSKI ET AL., 2001) und kann systemische Mykosen, wie z.B. Trichosporonosis, und hypersensitive Pneumonie beim Menschen verursachen (EVANS ET AL., 1980; SHIMAZU ET AL., 1984; ANDO ET AL.,

1990; SUGITA ET AL., 1995). In der vorliegenden Studie wurde *T. cutaneum* auch nur bei den Bauernkindern gefunden.

Beim Vergleich der dominanten Spezies bei Asthmatikern gegenüber Nicht-Asthmatikern tauchten zwei Kandidaten auf, die bereits bei der PCR-SSCP-Analyse mit einer potenziellen Asthma-Induktion in Verbindung gebracht wurden. *Didymella exitialis* war die dominante Spezies bei der positiv assoziierten Gelposition 1410; die Plausibilität dieses Ergebnisses wurde bereits vorab diskutiert (s. Punkt 5.3.1). *Phoma herbarum* zeigte sich sowohl bei der Gelposition 1410 als auch bei der weiteren positiv assoziierten Gelposition 53,0 %. Bei letzterer lag jedoch *Sydowia polyspora* als dominante Spezies vor. *Ph. herbarum* wird in Verbindung mit Wasserschäden im Haus gefunden; Hauttests bei asthmatischen Schulkindern waren ebenfalls positiv (TASKINEN ET AL., 1997). Als häufiger bei nicht-asthmatischen Kindern vorkommend und damit als mögliche Asthma-protective Kandidaten konnten *Exophiala* sp. und *E. amstelodami* detektiert werden, die bereits zuvor als Asthma-protectiv in Erscheinung traten (s. Punkt 5.1.3; EGE ET AL., 2011). Allerdings basierten diese Ergebnisse auf dem Vergleich der relativen Häufigkeiten dominanter OTUs zwischen den vier Probengruppen ohne Miteinbeziehung von Signifikanztests.

Unter Einbeziehung aller repräsentativen OTU-Sequenzen (nosingletons) und biostatistischer Testung wurden drei Spezies wiedergefunden, die bereits im Zuge der PCR-SSCP-Analyse mit einer inversen Assoziation zu allergischem Asthma auftauchten – *Aureobasidium pullulans* (s.a. Punkt 5.3.1), *Botryotinia fuckeliana* und *Cryptococcus* spp. (Tabelle 38). Zudem sind *Bullera globispora* und *Dioszegia fristingerensis* eng verwandt mit *Cryptococcus dimennae* bzw. gehören zur Gruppe der Tremellales, wozu auch alle *Cryptococcus* spp. zählen (TAKASHIMA ET AL., 2003; RENKER ET AL., 2004). *Bo. fuckeliana* und *Cryptococcus* spp. wurden jedoch zunächst aufgrund des dominanten Vorkommens von *Wallemia muriae* bei der PCR-SSCP Gelposition 77,2 % nicht näher betrachtet.

Beschrieben ist *Bo. fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) in Verbindung mit Graufäule an Weintrauben, Getreide und Gemüse und verursacht dabei Quantitäts- und Qualitätsverluste (LEROUX ET AL., 1999). Jedoch wird im Review von JÜRGENSEN UND MADSEN (2009) postuliert, dass Allergietests neben den dominanten Genera *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* und *Aspergillus* auch *Botrytis cinerea* mit einschließen sollten. *Bo. cinerea* Sporen machen zwar nur 1-2 % in der Luft aus, sind aber im Mittel zu ca.

18 % an Allergien und hierbei u.a. auch bei der Entstehung von Asthma beteiligt. Zudem zeigten sie ein mindestens genauso hohes Allergieauslösungspotential wie die dominanten Genera bei jungen, finnischen Schulkindern mit diagnostiziertem oder vermutetem Asthma (IMMONEN ET AL., 2001; KORHONEN ET AL., 2006) und könnten so bei Kleinkindern auch eine Sensibilisierung in Gang setzen. MULLINS UND SEATON (1978) wiesen zusätzlich *Botrytis cinerea* in Sputum nach.

Beim Genus *Cladosporium* wurde bisher v.a. *Cl. neoformans* in Verbindung mit humanen Erkrankungen wie Meningitis im Allgemeinen und pulmonären Dysfunktionen im Speziellen beschrieben (GOLDMAN ET AL., 2006; MÜLLER ET AL., 2007; RAMANA ET AL., 2012). Allerdings wurde diese Spezies in dieser Studie nicht identifiziert. Als einzige der hier gefundenen Spezies wurde bisher nur der als Apfelschädling bekannte (ROBERTS, 1990) *Cr. laurentii* in Verbindung mit Lungenerkrankungen beschrieben (LYNCH ET AL., 1981; JOHNSON ET AL., 1998). Humane Infektionen mit diesen Spezies sind jedoch rar. Über die weiteren Spezies *Cr. dimennae*, *Cr. flavescens* und *Cr. victoriae* ist generell nur wenig aussagekräftige Literatur vorhanden.

Phoma herbarum und *Ph. macrostoma* waren zwar bei den invers assoziierten OTU-Sequenzen dabei, bei der PCR-SSCP-Analyse waren diese jedoch bei den Asthma-induzierenden Gelpositionen 1410 und 53,0 % (Tabelle 34) vertreten.

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie wurde die robuste und günstige PCR-SSCP-Methode für die Untersuchung von Pilzgemeinschaften unter Verwendung des PowerSoil™ DNA Isolation Kits und des universellen Pilzprimerpaares ITS1/ITS4 optimiert. Mit den ermittelten Werten für das Detektionslimit und die Reproduzierbarkeit kann dieses Verfahren immer noch als eine der Standardmethoden für die mikrobielle Diversitätsbestimmung beurteilt werden. Da neue und teilweise automatisierbare Technologien immer mehr an Einfluss gewinnen, wurde für die Bestimmung der Diversität an Pilzspezies in Stall- und Matratzenstaubproben zusätzlich der Ansatz der 454 Parallelsequenzierung angepasst und die Ergebnisse mit der PCR-SSCP-Analyse verglichen. Eine Vergleichbarkeit zwischen beiden Methodiken und eine gegenseitige Bestätigung der Ergebnisse der vorliegenden Studie konnte als gegeben angesehen werden.

Beide Verfahren wurden für die molekular-epidemiologische Bestimmung von Assoziationen bestimmter Pilzspezies mit der Entstehung von allergischem Asthma eingesetzt. Mehrere möglicherweise invers (*Exophiala* sp., sechs *Penicillium* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Septoria lycopersici*, *Wallemia muriae*, *Botryotinia fuckeliana*, *Glyphium elatum* und *Phialophora europaea*) sowie auch positiv assoziierte Kandidaten (*Didymella exitialis*, *Saccharicola bicolor* und *Pseudotaeniolina globosa*) konnten identifiziert werden. Allerdings sollte die epidemiologische Pilotstudie unter Verwendung der 454 Parallelsequenzierungstechnologie analog zur PCR-SSCP-Analyse auf alle 844 Proben ausgeweitet werden, um die statistische Power dieser zu erhöhen.

Zudem sind weiterführende Untersuchungen notwendig: Einerseits sollte die Konzentration der einzelnen Spezies in den Proben mittels quantitativer PCR ermittelt werden (quantitative Bestimmung der Pilzexposition). Hierbei sollten auch *Epicoccum nigrum*, *Phoma herbarum* und *Ph. macrostoma* miteinbezogen werden, die in den bisherigen Untersuchungen sowohl als positiv als auch als invers mit Asthma assoziiert identifiziert wurden. Zum anderen sind, bezugnehmend auf die epidemiologischen Daten, nun wissenschaftsbasierte, gezielte Tierversuche möglich, um eine Auslösung oder Modulierung der allergischen Immunantwort durch die betreffenden Pilzspezies zu ermitteln.

7 Zusammenfassung

In den letzten Jahren erhöhte sich das Interesse für die umweltbedingte Exposition des Menschen mit Mikroorganismen über Luft und Staub, insbesondere in Bezug auf mögliche gesundheitliche Auswirkungen. Die Bestimmung der Diversität der Exposition wird allerdings häufig noch kulturell oder über die Messung von Metaboliten (z.B. Toxine) oder anderer mikrobieller Bestandteile (z.B. EPS) durchgeführt. Jedoch ist bekannt, dass zahlreiche Mikroorganismen, insbesondere Pilze, teilweise nur schwer oder überhaupt nicht mit den klassischen Nährmedien zu bestimmen sind und die Quantifizierung der strukturellen Bestandteile und/oder der Metabolite nicht die gesamte Diversität wiedergeben. Kultur-unabhängige Methoden können helfen, diese Einschränkungen zu umgehen, indem sie auf Ebene der primären DNA-Sequenz eine Bestimmung der Diversität zulassen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie in einem ersten Schritt die Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) Methode für die Untersuchung von Pilzgemeinschaften in Stall- und Hausstaubproben optimiert und evaluiert. Bei der Auswahl eines geeigneten DNA-Extraktionsverfahrens und eines universellen Primerpaares zeigten der Power Soil™ DNA Isolation Kit und das Primerpaar ITS1/ITS4 die besten Ergebnisse. Das Detektionslimit der Methode lag bei 200 CFU/g Staub; die Reproduzierbarkeitswerte schwankten zwischen 88 und 94 % im Mittel. Da bei dem gelbasierten System der PCR-SSCP-Analyse keine direkte eine-Bande-eine-Spezies-Aussage möglich war, sondern die Spezies durch nachfolgende Sequenzierung ausgewählter Banden ermittelt werden musste, wurde zudem zur Ermöglichung einer direkten, parallelen Sequenzierung die 454 Technologie im Sinne einer Amplikonsequenzierung mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 etabliert. Vergleiche zwischen den beiden Verfahren und mit der kulturellen Bestimmung zeigten übereinstimmende Ergebnisse.

Die Diversitätsanalyse von Stall- und Matratzenstaubproben ergab, dass *Epicoccum nigrum* in allen Proben sehr häufig detektiert werden konnte und in vielen Proben die dominante Spezies war. Darüber hinaus konnten *Cladosporium* spp. im Kuhstall, *Candida* spp. im Schweinestall sowie *Microdochium nivale* und *Cryptococcus victoriae* im Hühnerstall sehr häufig nachgewiesen werden. Im Hühnerstallstaub wurde zudem erstmals die rote Vogelmilbe (*Dermanyssus gallinae*) mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 detektiert. Die vorherrschenden Spezies in den Matratzenstaubproben

waren *Cryptococcus* spp., *Eurotium repens*, *Pichia fermentans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Debaromyces hansenii*, *Didymella exitialis*, *Alternaria alternata* uvm., wobei *Leptosphaerulina* spp., *Al. alternata* und *Au. pullulans* häufiger bei den Nichtbauern, *Cl. cladosporioides*, *E. repens*, *Pi. fermentans*, *Trichosporon cutaneum* und *Wallemia sebi* dagegen häufiger bei den Bauern zu finden waren.

Zur Überprüfung der vor knapp 20 Jahren postulierten Hygienehypothese wurden, auf Basis zahlreicher epidemiologischer Studien, die das Aufwachsen auf dem Bauernhof mit einer geringeren Allergie- und Asthmaprävalenz in Verbindung brachten („Bauernhofeffekt“), in dieser Studie mit Hilfe der PCR-SSCP-Methode 844 und mit der 454 Pyrosequenzierung 60 Matratzenstaubproben von Schulkindern vom Bauernhof und deren Nachbarn mit oder ohne diagnostiziertem Asthma untersucht. Als signifikant invers mit Asthma assoziierte und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit Asthma-protective Kandidaten konnten *Exophiala* sp., sechs *Penicillium* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Wallemia muriae* und *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) identifiziert werden. Asthma-induzierend schienen als Hauptkandidaten *Didymella exitialis*, *Sydowia polyspora* und *Cladosporium cladosporioides* zu wirken. Diese Ergebnisse sollen nun im tierischen Asthmodell überprüft werden.

8 Summary

Molecular-biological investigations of fungal diversity in shed and mattress dust samples by PCR-SSCP and 454 pyrosequencing

During recent years there was an increasing interest in the environmental exposure of humans towards microorganisms in air and dust samples, especially for health effects. Until now the determination of microbial diversity is often based on culture techniques and the measurement of microbial metabolites (i.e. toxins) or structural elements (i.e. EPS). But it is known that culturing on traditional growth media is challenging or not possible with the majority of microorganisms, especially fungi. Moreover, the determination of the quantity of structural elements and/or metabolites does not reflect diversity. Culture-independent methods could help to circumvent these limitations by investigation of the diversity on the basis of the primary DNA sequence. In this study, the polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis was optimized and evaluated for the investigation of fungal communities in shed and house dust samples. The comparison of different DNA extraction methods and universal primer combinations showed Power Soil™ DNA isolation kit and the primer pair ITS1/ITS4 with the best results. The detection limit of the method was 200 CFU/g dust and reproducibility varied between 88 and 94 % in average. However, a direct declaration on the basis of one-band-one-species was not possible using the gel-based PCR-SSCP system, which, therefore, had to be followed by sequencing of chosen bands to identify specific species. Hence, beside PCR-SSCP, direct, parallel amplicon sequencing with the 454 technology was established with the primer pair ITS1/ITS4. Comparisons of both methods and with cultures led to the same results.

The diversity analysis of shed and mattress dust samples showed *Epicoccum nigrum* as common in all and dominant in a lot of samples. Furthermore, *Cladosporium* spp. in cow shed, *Candida* spp. in swine shed as well as *Microdochium nivale* and *Cryptococcus victoriae* in chicken shed were found frequently. In chicken shed dust, the first time, the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) was detected with ITS1/ITS4. The predominant species in the mattress dust samples were *Cryptococcus* spp., *Eurotium repens*, *Pichia fermentans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans*, *Leptosphaerulina chartarum*, *Debaromyces hansenii*, *Didymella exitialis*, *Alternaria*

alternata and others. *Leptosphaerulina* spp., *Al. alternata* und *Au. pullulans* were present more often in samples of the non-farmers as well as *Cl. cladosporioides*, *E. repens*, *Pi. fermentans*, *Trichosporon cutaneum* und *Wallemia sebi* in samples of the farmers.

On the basis of several epidemiological studies which showed a protective effect of growing up on a farm towards the development of allergies and asthma ("farm effect"), mattress dust samples of 844 school children living on a farm and of their neighbours with or without doctor's diagnosed asthma were investigated to survey the hygiene hypothesis postulated 20 years ago. Additionally, 60 samples were examined by 454 pyrosequencing. As invers with asthma associated candidates and, therefore, highly probable for an asthma protective effect *Exophiala* sp., six *Penicillium* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Wallemia muriae* and *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) were identified. On the other side, *Didymella exitialis*, *Sydowia polyspora* and *Cladosporium cladosporioides* seemed to be asthma inducers. These results should now be verified by animal experiments.

9 Literaturverzeichnis

A

Abbott MA, Poiesz BJ, Byrne BC, Kwok S, Sninsky JJ, Ehrlich GD (1988) Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in vitro. *J Infect Dis* 158: 1158-1169.

Abdel Hameed AA, Yasser IH, Khoder IM (2004) Indoor air quality during renovation action: a case study. *J Environ Monit* 6: 740-744.

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (2004) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München, 9. Auflage, S. 855-866.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.

Amend S, Seifert K, Bruns TD (2010a) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Mol Ecol* 19: 5555-5565.

Amend S, Seifert K, Samson R, Bruns TD (2010b) Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *PNAS* 107: 13748-13753.

Andersen A (1985) Microfungi in beds and their relation to house-dust mites. *Grana* 24: 55-59.

Andersen SJ, Frisvad JC (1994) Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. *Letters Appl Microbiol* 19: 486-488.

Andersen SJ (1995) Compositional changes in surface microflora during ripening of naturally fermented sausages. *J Food Protect* 58: 426-429.

Anderson IC, Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* 6: 79-779.

Anderson IC, Campbell CD, Prosser IJ (2003) Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ Microbiol* 5: 36-47.

Ando M, Sakata T, Yoshida K, Yamasaki H, Araki S, Onoue K, Shinoda T (1990) Serotype-related antigen of *Trichosporon cutaneum* in the induction of summer-type hypersensitivity pneumonitis: correlation between serotype of inhalation challenge-positive antigen and that of the isolates from patient's home. *J Allergy Clin Immunol* 85: 36-44.

Antonicelli L, Bucca C, Neri M, De Benedetto F, Sabbatani P, Bonifazi F, Eichler H-G, Zhang Q, Yin DD (2004) Asthma severity and medical resource utilization. *Eur Respir J* 23: 723-729.

Atkinson L, Adams ES (1997) Double-strand conformation polymorphism (DSCP) analysis of the mitochondrial control region generates highly variable markers for population studies in a social insect. *Insect Mol Biol* 6: 369-376.

B

Badali H, Hedayati MT, Bahoosh M, Kasiri A, Ghasemi M, Motahari J, Meis JF, de Hoog GS (2011) *Exophiala oligosperma* involved in a refractory chronic rhinosinusitis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 15: 319-323.

Bains W, Smith GC (1988) A novel method for nucleic acid sequence determination. *J Theoret Biol* 135: 303-307.

Barnes PJ, Jonsson B, Klim JB (1996) The costs of asthma. *Eur Respir J* 9: 636-642.

Baruah HK (1961) The air spora of a cow shed. *J Gen Microbiol* 25: 488-491.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Anal Biochem* 196: 80-83.

Battey AS, Duffy S, Schaffner DW (2001) Modelling mold spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. *Food Microbiol* 18: 521-529.

Bauer J, Schwaiger K (2011) Teil IV. Allgemeine Mykologie. Grundlagen. In: Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P (Editoren) Tiermedizinische Mykologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke Verlag, Stuttgart, S. 357.

Bauman DS, Smith CD (1975) Comparison of immunodiffusion and complement fixation tests in the diagnosis of histoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2: 77.

Beasley JN, Blalock LD, Neslon TS, Templeton GE (1980) The effect of feeding corn molded with *Penicillium lanosum* to broiler chicks. *Poultry Sci* 59: 708-718.

Beasley R (2002) The burden of asthma with specific reference to the United States. *J Allergy Clin Immunol* 109: S482-489.

Becker JM, Covert NL, Shenbagamurthi P, Steinfeld AS, Naider F (1983) Polyoxin D inhibits growth of zoopathogenic fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 926-929.

Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010) Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 99-108.

Beguín H (1995) Mould biodiversity in homes II. Analysis of mattress dust. *Aerobiologica* 11: 3-10.

Beguín H, Nolard N (1996) Prevalence of fungi in carpeted floor environment: analysis of dust samples from living-rooms, bedrooms, offices and classrooms. *Int J Aero* 12: 113-120.

- Bellanger AP, Bories C, Foulet F, Bretagne S, Botterel F** (2008) Nosocomial dermatitis caused by *Dermanyssus gallinae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29: 282-283.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H** (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10: 189.
- Bennett JW, Klich M** (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16: 497-516.
- Biedunkiewicz A, Schulz L** (2012) Fungi of the genus *Exophiala* in tap water – potential ecological factor of phaeohyphomycosis. *Mikologia Lekarska* 19: 23-26.
- Black PN, Udy AA, Brodie SM** (2000) Sensitivity to fungal allergens is a risk factor of life-threatening asthma. *Allergy* 55: 501-504.
- Black J** (2009) Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) of filamentous fungi in carpet. RTI press, Research Triangle Park, NC.
- Borneman J, Hartin RJ** (2000) PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 66: 4356-4360.
- Bramam SS** (2006) The global burden of asthma. *CHEST* 130: 4S-12S.
- Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E** (2002) Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *NEJM* 347: 869-877.
- Braun-Fahrländer C, Lauener RP** (2003) Farming and protective agents against allergy and asthma. *Clin Exp Allergy* 33: 409-411.
- Breed R, Dotterer WD** (1916) The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. *J Bacteriol* 1: 321-331.
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridgbe RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K** (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* 18: 630-634.
- Brodie E, Edwards S, Clipson N** (2003) Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 105-114.
- Bruns TD, Shefferson RP** (2004) Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Can J Bot* 82: 1122-1132.
- Burge HA** (1985) Fungus allergens. *Clin Rev Allergy* 3: 319-329.
- Burge PS** (2004) Sick building syndrome. *Occup Environ Med* 61: 185-190.
- Burr ML, Davies BH, Hoare A, Jones A, Williamson IJ, Holgate SK, Arthurs R, Hodges IGC** (1999) A confidential inquiry into asthma deaths in Wales. *Thorax* 54: 985-989.

Bush PK, Portnoy JM (2001) The role and abatement of fungal allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 107: S430-440.

Butin H, Wagner C (1985) Mykologische Untersuchungen zur "Nadelröte" der Fichte. *Forstwirtschaftliches Centralblatt* 104: 179-186.

C

Campbell CC, Binkley GE (1953) Serologic diagnosis with respect to histoplasmosis, coccidiomycosis, and blastomycosis and the problem with cross reactions. *J Lab Clin Med* 42: 896.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Gonzalez Pena A, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenkov T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7: 335-336.

Cassidy JR, Moore D, Lu BC, Pukkila PJ (1984) Unusual organization and lack of recombination in the ribosomal RNA genes of *Coprinus cinereus*. *Curr Genetics* 8: 607-613.

Chauve C (1998) The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Vet Parasitol* 79: 239-245.

Chi ZM, Wang F, Chi Z, Yue LX, Liu GL, Zhang T (2009) Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 82: 793-804.

Chou H, Tam MF, Lee L-H, Chiang C-H, Tai H-Y, Panzani RC, Shen H-D (2008) Vacuolar serine protease is a major allergen of *Cladosporium cladosporioides*. *Int Arch Allergy Immunol* 146: 277-286.

Chung YJ, Coates NH, Viana ME, Copeland L, Vesper SJ, Selgrade MK, Ward MDW (2005) Dose-dependent allergic responses to an extract of *Penicillium chrysogenum* in BALB/c mice. *Toxicol* 209: 77-89.

Ciardo DE, Schär G, Böttger EC, Altwegg M, Bosshard PP (2006) Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 44: 77-84.

Circella E, Pugliese N, Todisco G, Cafiero MA, Sparagano OAE, Camarda A (2011) *Chlamydia psittaci* infection in canaries heavily infested by *Dermanyssus gallinae*. *Exp Appl Acarol* 55: 329-338.

Cohan FM (2002) What are bacterial species. *Ann Rev Microbiol* 56: 457-487.

Coleman RM, Kaufman L (1972) Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *Appl Microbiol* 23: 301.

Conrad C (2001) Nachweis von Antikörpern gegen *Exophiala dermatitidis* bei Patienten mit zystischer Fibrose. Dissertation med., Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen.

Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Hutson JC, Williams HJ, Schwab CJ, Straus DC (2000) An animal model for allergic penicilliosis produced by the intranasal instillation of viable *Penicillium chrysogenum* conidia. *Thorax* 55: 489-496.

Cromey MG, Ganev S, Braithwaite M, Boddington HJ (1994) *Didymella exitialis* on wheat in New Zealand. *NZ J Crop Hort Sci* 22: 139-144.

D

Dankaart WF, Smithuis LO, Blaauw PJ, Spieksma FT (1991) The appearance of pollen in the lower airways. *Grana* 30: 113-114.

Day JH, Ellis AK (2001) Allergenic microorganisms and hypersensitivity. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), *Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 4.1: 101-128.

Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blümer N, von Mutius E, Bufe A, Gatermann S, Renz H, Holst O, Heine H (2007) *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains, isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 119: 1514-1521.

De Hoog GS (1997) *Rhinocladiella* and related genera. *Stud Mycol* 15: 1-140.

De Hoog GS, Mayser P, Haase G, Horr  R, Horrevorts AM (2005) A new species, *Phialophora europaea*, causing superficial infections in humans. *Mycoses* 43: 409-416.

De Leo F, Urz  C, de Hoog GS (2003) A new meristematic fungus, *Pseudotaeniolina globosa*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 351-360.

Desloire S, Valiente Moro C, Chauve C, Zenner L (2006) Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet Res* 37: 725-732.

Dix NJ, Webster J (1995) *Fungal ecology*. Chapman & Hall, London.

Dixit AB, Lewis HW, Wedner HJ (1992) The allergens of *Epicoccum nigrum* Link. *J Allergy Clin Immunol* 90: 11-20.

Dohrmann AB, Tebbe CC (2004) Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). In: Kowalschuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Akkermans AD, van Elsas JD (Editoren) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 809-838.

Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980) *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London.

- Dorn-In S** (2012) Untersuchungen zur Rekonstruktion der ursprünglichen Pilzflora hitzebehandelter Lebensmittel mittels qPCR und PCR-SSCP. Dissertation med. vet., Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Dorn-In S, Hölzel CS, Janke T, Schwaiger K, Balsliemke J, Bauer J** (2013) PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products. *Int J Food Microbiol* 162: 71-81.
- Douwes J, van der Sluis B, Doekes G, van Leusden F, Wijnands L, van Strien R, Verhoeff A, Brunekreef B** (1999) Fungal extracellular polysaccharides in house dust as a marker for exposure to fungi: relations between culturable fungi, reported house dampness, and respiratory symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 103: 494-500.
- Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D** (2003) Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg* 47: 187-200.
- Douwes J, Cheng S, Travier N, Cohet C, Niesink A, McKenzie J, Cunningham C, Le Gros G, von Mutius E, Pearce N** (2008) Farm exposure *in utero* may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J* 32: 603-611.
- Downs SH, Mitakakis TZ, Marks GB, Car NG, Belousova EG, Leüppi JD, Xuan W, Downie SR, Tobias A, Peat JK** (2001) Clinical importance of *Alternaria* exposure in children. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 455-459.
- Du X-H, Zhao O, Yang ZL, Hansen K, Taskin H, Büyükalaca S, Dewsbury D, Moncalvo J-M, Douhan GW, Robert VA, Crous PW, Rehner SA, Rooney AP, Sink S, O'Donnell K** (2012) How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*)? *Mycologia*, 12-056, Epub ahead of print.
- Duchaine C, Mériaux A** (2001) The importance of combining air sampling and surface analysis when studying problematic houses for mold biodiversity determination. *Aerobiol* 17: 121-125.
- Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD** (1990) Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 142: 1351-1358.
- E**
- Edgar RC** (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461.
- Ege MJ, Biele C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Ublagger E, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Scheynius A, Pershagen G, Benz MR, Lauener RP, von Mutius E, PARSIFAL study team** (2006) Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *J Allergy Clin Immunol* 117: 817-823.
- Ege MJ, Frei R, Bieli C, Schram-Bijkerk D, Waser M, Benz MR, Weiss G, Nyberg F, van Hage M, Pershagen G, Brunekreef B, Riedler J, Lauener R, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, and the PARSIFAL Study team** (2007) Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children. *J Allergy Clin Immunol* 119: 1140-1147.

Ege MJ, Mayer M, Normand A-C, Genuneit J, Cooksen WOCM, Braun-Fahrländer C, Heederik D, Piarroux R, von Mutius E, for the GABRIELA Transregio 22 Study Group (2011) Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med* 364: 701-709.

Ege MJ, Mayer M, Schwaiger K, Mattes J, Pershagen G, van Hage M, Scheynius A, Bauer J, von Mutius E (2012) Environmental bacteria and childhood asthma. *Allergy* 67: 1565-1571.

Environmental Protection Agency, USA (2009) EPA technology for mold identification and enumeration. Microbiological and chemical exposure assessment research.

Eriksson OE, Hawksworth DL (2003) *Saccharicola*, a new genus for two *Leptosphaeria* species on sugar cane. *Mycologia* 95: 426-433.

European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Association (EFAADPA) (2005) Fighting for breath: a European patient perspective on severe asthma.

European Respiratory Society (ERS), European Lung Foundation (ELF) (2003) European Lung White Book: the first comprehensive survey on respiratory health in Europe. *Eur Respir Soc J Ltd*, Loddenkemper R, Brüssel.

Evans HL, Kletzel M, Lawson RD, Frankel LS, Hopper RL (1980) Systemic mycosis due to *Trichosporon cutaneum*. *Cancer* 45: 367-371.

F

Feinstein LM, Sul WJ, Blackwood CB (2009) Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from Soil. *Appl Environ Microbiol* 75: 5428-5433.

Filipello Marchisio V, Sulotto F, Botta GC, Chiesa A, Airaudi D, Anastasi A (1999) Aerobiological analysis in a salami factory: a possible case of extrinsic allergic alveolitis by *Penicillium camembertii*. *Med Mycol* 37: 285-289.

Fischer G, Dott W (2003) Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Arch Microbiol* 179: 75-82.

Fisher MM, Triplett EW (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 65: 4630-4636.

Fisk WJ, Lei-Gomez Q, Mendell MJ (2007) Meta-analysis of the association of respiratory health effects with dampness and mold in homes. *Indoor Air* 17: 284-296.

Flannigan B (2001) Microorganisms in indoor air. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), *Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 1.2: 17-34.

Flannigan B, Miller JD (2001) Microbial growth in indoor environments. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), *Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 2.1: 35-68.

Floréz AB, Belloch C, Álvarez-Martín P, Querol A, Mayo B (2010) *Candida cabralensis* sp. nov., a yeast species isolated from traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese. *Int J Sys Evol Microbiol* 60: 2671-2674.

Fraison J-B, Guilpain P, Schiffmann A, Veyrac M, Le Moing V, Rispaill P, Le Quellec A (2012) Pulmonary cryptococcosis in a patient with Crohn's disease treated with prednisone, azathioprine and adalimumab: exposure to chicken manure as a source of contamination. *J Crohn's Colitis*, In press.

Fredlund E, Gidlund A, Olsen M, Börjesson T, Spliid NHH, Simonsson M (2008) Method evaluation of *Fusarium* DNA extraction from mycelia and wheat for downstream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels. *J Microbiol Methods* 73: 33-40.

Frisvad JC, Larsen TO, Dalsgaard PW, Seifert KA, Louis-Seize G, Lyhne EK, Jarvis BB, Fettinger JC, Overy DP (2006) Four psychrotolerant species with high chemical diversity consistently producing cycloaspeptide A, *Penicillium jamesonlandense* sp. nov., *Penicillium ribium* sp. nov., *Penicillium soppii*, and *Penicillium lanosum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1427-1437.

G

Gams W (1971) *Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: S. 61.

Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol Ecol* 2: 113-118.

Gehring U, Heinrich J, Hoek G, Giovannangelo M, Nordling E, Bellander T, Gerritsen J, de Jongste JC, Smit HA, Wichmann H-E, Wickman M, Brunekreef B (2007) Bacteria and mould components in house dust and children's allergic sensitization. *Eur Resp J* 29: 1144-1153.

Geisen R (1995) Characterization of the species *Penicillium nalgiovense* by RAPD- and protein patterns and its comparison with *Penicillium chrysogenum*. *System Appl Microbiol* 18: 595-601.

Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 59: 1-10.

Gell PGH, Coombs RRA (1963) The classification of allergic reactions underlying disease. In: Coombs RRA, Gell PGH (Editoren), *Clinical Aspects of Immunology*, Blackwell, Oxford.

- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, van Elsas JD** (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 38: 1-15.
- Genuneit J, Büchele G, Waser M, Kovacs K, Debinska A, Boznanski A, Strunz-Lehner C, Horak E, Cullinan P, Heederik D, Braun-Fahrlander C, von Mutius E and the GABRIELA Study Group** (2011) The GABRIEL Advanced Surveys: study design, participation and evaluation of bias. *Paediatric Perinatal Epidemiol* 25: 436-447.
- Gerritsen J, Koeter GH, Postma DS, Schouten JP, Knol K** (1989) Prognosis of asthma from childhood to adulthood. *Am Rev Respir Dis* 140: 1325-1330.
- Giller KE, beare MH, Lavelle P, Izac A-MN, Swift MJ** (1997) Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl Soil Ecol* 6: 3-16.
- Godard P, Chanez P, Siraudin L, Nicoloyannis N, Duru G** (2001) Costs of asthma are correlated with severity: a 1-yr prospective study. *Eur Respir J* 19: 61-67.
- Goldman DL, Davis J, Bommarito F, Shao X, Casadevall A** (2006) Enhanced allergic inflammation and airway responsiveness in rats with chronic *Cryptococcus neoformans* infection: potential role for fungal pulmonary infection in the pathogenesis of asthma. *J Infect Dis* 193: 1178-1186.
- Göttlich E, van der Lubbe W, Lange B, Fiedler S, Melchert I, Reifenrath M, Flemming H-C, de Hoog S** (2002) Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int J Hyg Environ Health* 205: 269-279.
- Grant C, Hunter CA, Flannigan B, Bravery AF** (1989) Water activity requirements of moulds isolated from domestic dwellings. *Int Biodeterioration* 25: 259-284.
- Gravesen S, Nielsen PA, Nielsen KF** (1997) Microfungi in water damaged buildings. SBI Report No. 282, Danish Building Research Institute, Copenhagen, Denmark.
- Green BJ, Tovey ER, Beezhold DH, Perzanowski MS, Acosta LM, Divjan AI, Chew GL** (2009) Surveillance of fungal allergic sensitization using the fluorescent halogen immunoassay. *J Mycol Med* 19: 253-261.
- Griffard EA, Guajardo JR, Cooperstock MS, Scoville CL** (2010) Isolation of *Exophiala dermatitidis* from pigmented sputum in a cystic fibrosis patient. *Pediatr Pulmonol* 45: 508-510.
- Guidot A, Lumini E, Debaud J-C, Marmeisse R** (1999) The nuclear ribosomal DNA intergenic spacer as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on Pinus root systems. *Appl Environ Microbiol* 65: 903-909.
- Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A** (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol* 169: 387-392.

Guillot M, Bertoletti L, Deygas N, Maberin H, Fareo Vergnon JM (2008) Pneumopathie a la fleur de saucisson: trois observation. Rev Mal Respir 25: 596-600.

H

Haase G, Skopnik H, Groten T, Kusenbach G, Posselt HG (1991) Long-term fungal cultures of sputum of patients with cystic fibrosis. Mycoses 34: 373-376.

Haase G (2009a) Pilze: Vorkommen und Bedeutung für den Menschen. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S (Editoren) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 6. Auflage, pp. 597-601.

Haase G (2009b) Biologie der Pilze. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S (Editoren) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 6. Auflage, pp. 602-606.

Haase G (2009c) Hefen. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S (Editoren) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 6. Auflage, pp. 607-614.

Hagn A, Pritsch K, Ludwig W, Schloter M (2003) Theoretical and practical approaches to evaluate suitable primer sets for the analysis of soil fungal communities. Acta Biotech 23: 373-381.

Haidle CW, Storck R (1966) Inhibition by cycloheximide of protein and RNA synthesis in *Mucor rouxii*. Biochem Biophys Res Commun 22: 175-180.

Hansma HG, Weisenhorn AL, Gould SAC, Sinsheimer RL, Gaub HE, Stucky GD, Zaremba CM, Hansma PK (1991) Progress in sequencing deoxyribonucleic acid with an atomic force microscope. J Vac Sci Technol 9: 1282-1284.

Harries MG, Lacey J, Tee RD, Cayley GR, Newman Taylor AJ (2004) *Didymella exitialis* and late summer asthma. Lancet 325: 1063-1066.

Harris JE, Sutton DA, Rubin A, Wickes B, de Hoog GS, Kovarik C (2009) *Exophiala spinifera* as a cause of phaeophycomycosis: case study and review of the literature. Med Mycol 47: 87-93.

Haugland RA, Heckman JL, Wymer LJ (1999) Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. J Microbiol Methods 37: 165-176.

Haugland RA, Vesper SJ (2002) Method of identifying and quantifying specific fungi and bacteria. EPA, Environmental Protection Agency, USA, US Patent 6387652.

Hawkes M, Rennie R, Sand C, Vaudry W (2005) *Aureobasidium pullulans* infection: fungemia in an infant and a review of human cases. Diagn Microbiol Infect Dis 51: 209-213.

Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA, Reynolds DR, Samson RA, Seifert KA, Taylor JW, Wingfield MJ, Abaci Ö, Aime C, Asan A, Bai F-Y, de Beer ZW, Begerow D, Berikten D, Boekhout T, Buchanan PK, Burgess T, Buzina W, Cai L, Cannon PF, Crane JL, Damm U, Daniel H-M, van Diepeningen AD, Druzhinina I, Dyer PS, Eberhardt U, Fell JW, Fisvad JC, Geiser DM, Geml J, Glienke C, Gräfenhan T, Groenewald JC, Groenewald M, de Gruyter J, Guého-Kellermann E, Guo L-D, Hibbett DS, Hong S-B, de Hoog GS, Houbraken J, Huhndorf SM, Hyde KD, Ismail A, Johnston PR, Kadaifciler DG, Kirk PM, Koljalg U, Krutzman CP, Lagneau P-M, Lévesque CA, Liu X, Lombard L, Meyer W, Miller A, Minter DW, Javad Najafzadeh M, Norvell L, Ozerskaya SM, Özic R, Pennycook SR, Peterson SW, Pettersson OV, Quaedvlieg W, Robert VA, Ruibal C, Schnürer J, Schroers H-J, Shivas R, Slippers B, Spierenburg H, Takashima M, Taskin E, Thines M, Thrane U, Haliki Uztan A, van Raak M, Varga J, Vasco A, Verkley G, Videira SIR; de Vries RP, Weir BS, Yilmaz N, Yurkov A, Zhang N (2011) The Amsterdam declaration of fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2: 105-112.

Hayashi K (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. Cold Spring Harb Lab Press 1: 34-38.

Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? Human Mutation 2:338-346.

Hayashi K (1997) Recent enhancements in PCR-SSCP. Genet Anal Biomol Eng 14: 193-196.

Health Canada (2004) Fungal contamination in public buildings: health effects and investigation methods. Health Canada, Ottawa.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. Genome Res 6: 986-994.

Heinrich J, Richter K, Magnussen H, Wichmann H-E (1998) Ist he prevalence of atopic diseases in East and West Germany already converging? Eur J Epidemiol 14: 239-245.

Helli PB, Pertens E, Janssen LJ (2005) Cyclopiazonic acid activates a Ca²⁺-permeable, nonselective cation conductance in porcine and bovine tracheal smooth muscle. J Appl Physiol 99: 1759-1768.

Hershkovitz MA, Lewis LA (1996) Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. Mol Biol Evol 13: 1276-1295.

- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora FW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai Y-C, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson K-H, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo J-M, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JD, Schüßler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N** (2007) A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycol Res* 111: 509-547.
- Hillis DM, Dixon MT** (1991) Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic interference. *Q Rev Biol* 66: 411-453.
- Hirvonen MR, Ruotsalainen M, Savolainen K, Nevalainen A** (1997) Effect of viability of actomycete spores on their ability to stimulate production of nitric oxide and reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages. *Toxicology* 124: 105-114.
- Hocking AD, Pitt JI** (1980) Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl Environ Microbiol* 39: 488-492.
- Hodgson MJ, Flannigan B** (2001) Occupational respiratory disease – hypersensitivity pneumonitis. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), *Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 3.2: 129-142.
- Holder IA, Kozinin PJ, Law EJ** (1977) Evaluation of *Candida* precipitin and agglutinin tests for the diagnosis of systemic candidiasis in burn patients. *J Clin Microbiol* 6: 219.
- Hong H, Pruden A, Reardon KF** (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods* 69: 52-64.
- Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y** (2006) Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J Microbiol Methods* 66: 165-169.
- Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB** (1995) Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev* 8: 161-179.
- Horst M, Hejjaoui A, Horst V, Michel FB, Bousquet J** (1990) Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extract. *J Allergy Clin Immunol* 85: 460-472.
- Horton TR, Bruns TD** (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol Ecol* 10: 1855-1871.

Hsieh KH, Shen JI (1988) Prevalence of childhood asthma in Taipei, Taiwan, and other Asian Pacific countries. *J Asthma* 25: 73-82.

Huang W-C, Lu Y-H, Lin Z-G, Su W-L (2010) Sauna lung: hypersensitivity pneumonitis due to *Exophiala jeanselmei*. *Respirology* 15: 573-579.

Hugenholtz P, Pace NR (1996) Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotech* 14: 190-197.

Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch M (2007) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genomic Biol* 8: R143.

Hyman ED (1988) A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* 174: 423-436.

Hyvärinen A, Meklin T, Vepsäläinen A, Nevalainen A (2002) Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials – concentrations and diversity. *Int Biodeterioration and Biodegradation* 49: 27-37.

I

Immonen J, Meklin T, Taskinen T, Nevalainen A, Korppi M (2001) Skin-prick test findings in students from moisture- and mould-damaged schools: a 3-year follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol* 12: 87-94.

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME (2002) Utilization of the internal transcribed spacer region as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 40: 87-109.

Izzo A, Agbowo J, Bruns TD (2005) Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytol* 166: 619-630.

J

Jacob B, Ritz B, Gehring U, Koch A, Bischof W, Wichmann HE, Heinrich J, for the INGA-Study Group (2002) Indoor exposure to molds and allergic sensitization. *Environ Health Perspect* 110: 647-653.

Jarvis BB, Miller JD (2004) Mycotoxins as harmful indoor contaminants. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 367-372.

Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA (1998) Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcaemia. *Mycoses* 41: 277-280.

Joshi A, Singh R, Shah MS, Umesh S, Khattry N (2010) Subcutaneous mycosis and fungemia by *Aureobasidium pullulans*: a rare pathogenic fungus in a post allogeneic BM transplant patient. *Bone Marrow Transpl* 45: 203-204.

Jürgensen CW, Madsen AM (2009) Exposure to the airborne mould *Botrytis cinerea* and its health effects. *Ann Agric Environ Med* 16: 183-196.

Jumpponen A, Jones KL (2009) Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytol* 184: 438-448.

Jussila J, Komulainen H, Kosma V-M, Pelkonen J, Hirvonen M-R (2002) Inflammatory potential of the spores of *Penicillium spinulosum* isolated from indoor air of a moisture-damaged building in mouse lungs. *Environ Tox Pharmacol* 12: 137-145.

K

Kaarakainen P, Rintala H, Vepsäläinen A, Hyvärinen A, Nevalainen A, Meklin T (2009) Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Sci Total Environ* 407: 4673-4680.

Kabel PJ, Illy KE, Holl RA, Buiting AGM, Wintermans RGF (1994) Nosocomial intravascular infection with *Exophiala dermatitidis*. *Lancet* 344: 1167-1168.

Kabesch M, Lauener RP (2004) Why old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis. *J Leukocyte Biol* 75: 383-387.

Karakousis A, Tan L, Ellis D, Alexiou H, Wormald PJ (2006) An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microbiol Methods* 65: 38-48.

Karwowska E (2005) Microbiological air contamination in farming environment. *Polish J Environ Studies* 14: 445-449.

Kauffman HF, van der Heide S (2003) Exposure, sensitization, and mechanisms of fungus-induced asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 3: 430-437.

Kaufman L, Clark MJ (1974) Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion tests in the diagnosis of coccidiomycosis. *Appl Microbiol* 28: 641.

Kay AB (2001) Allergy and allergic diseases: first of two parts. *N Engl J Med* 344: 30-37.

Kerr JR, Curran MD (1996) Applications of polymerase chain reaction-single stranded conformation polymorphism to microbiology. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 49: M315-M320.

Keswani J, Kashon ML, Chen BT (2005) Evaluation of interference to conventional and real-time PCR for detection and quantification of fungi. *J Environ Monit* 7: 311-318.

Khrapko KR, Lysov Yu P, Khorlyn AA, Shick VV, Florentiev VL, Mirzabekov AD (1989) An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett* 256: 118-122.

King AD, Hocking AD, Pitt JI (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl Environ Microbiol* 37: 959-964.

Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA (2001) *Ainsworth & Bilby's Dictionary of the Fungi*. CABI Publishing, Wallingford, 9. Auflage.

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58: 169-188.

- Klausmeier RE** (1972) Results of the second interlaboratory experiment in biodeterioration of plastics. *Int Biodeterior Bull* 8: 3-7.
- Kolossa-Gehring M, Becker K, Conrad A, Ludecke A, Riedel S, Seiwert M, Schulz C, Szewczyk R** (2007) German Environmental Survey for Children (GerES IV) – First results. *Int J Hyg Environ Health* 210: 535-540.
- Korhonen K, Mahonen S, Hyvarinen A, Nevalainen A, Husman T, Pekkanen J, Korppi M** (2006) Skin test reactivity to molds in pre-school children with newly diagnosed asthma. *Pediatr Int* 48: 577-581.
- Korpi A, Pasanen A-L, Pasanen P, Kalliokoski P** (1997) Microbial growth and metabolism in house dust. *Int Biodeterioration Biodegradation* 40: 19-27.
- Korthals M, Ege MJ, Tebbe CC, von Mutius E, Bauer J** (2008a) Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust. *J Microbiol Methods* 73: 49-56.
- Korthals M, Ege MJ, Lick S, von Mutius E, Bauer J** (2008b) Occurrence of *Listeria* spp. in mattress dust of farm children in Bavaria. *Environ Research* 107: 299-304.
- Korthals M** (2009) Molekular-epidemiologische Untersuchungen zur Erfassung "Asthma-protektiver" Bakterien im bäuerlichen Milieu. Dissertation rer. nat., Technische Universität München.
- Köster H, Beck S, Coull JM, Dunne T, Gildea BD, Kissinger C, O'Keeffe T** (1991) Oligonucleotide synthesis and multiplex DNA sequencing using chemiluminescent detection. *Nucleic Acid Symp Ser* 24: 318-321.
- Köster H, Tang K, Fu D-J, Braun A, van den Boom D, Smith CL, Cotter RJ, Cantor CR** (1996) A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14: 1123-1128.
- Krukowski H, Tietze M, Majewski M, Różanski P** (2000) Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathol* 150: 5-7.
- Kück U, Nowrousian M, Hoff B, Engh I** (Editoren) (2009) Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden und Bekämpfung. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Deutschland, 3. Auflage.
- Kumar M, Shukla PK** (2005) Use of PCR-targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *J Clin Microbiol* 43: 662-668.
- Kumeda Y, Asao T** (1996) Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus section flavi*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2947-2952.
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P** (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ Microbiol* 12: 118-123.

Kurtzman CP, Wickerham LT, Hesseltine CW (1970) Yeasts from wheat and flour. *Mycologia* 62: 542-547.

Kusenbach G, Skopnik H, Haase G, Friedrichs F, Döhmen H (1992) *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 151: 344-346.

L

Lacey J (1996) Spore dispersal – its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology. *Mycol Res* 100: 641-660.

Lakay FM, Botha A, Prior BA (2007) Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J Appl Microbiol* 102: 265-273.

Lauener RP, Birchler T, Adamsky J, Braun-Fahrländer C, Bufe A, Herz U, von Mutius E, Nowak D, Riedler J, Waser M, Sennhauser FH, ALEX Study Group (2002) Expression of CD-14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children- *Lancet* 360: 465-466.

Le Bars J (1979) Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camembertii* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese. *Appl Environ Microbiol* 38: 1052-1055.

Lee D-H, Zo Y-G, Kim S-J (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single strand conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 62: 3112-3120.

Leff LG, Dana JR, McArthur JV, Shimkets LJ (1995) Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl Environ Microbiol* 61: 1141-1143.

Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT (2005) Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *J Clin Microbiol* 43: 4943-4953.

Leistner L, Pitt JI (1977) Miscellaneous *Penicillium* toxins. In: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA (Editoren) *Mycotoxins in human and animal health*. Pathatox Publishers, Inc., Park Forest South, Ill., USA, pp. 639-653.

Leistner L (1990) Mould-fermented foods: recent developments. *Food Biotechnol* 4: 433-441.

Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D, Gredt M (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protect* 18: 687-697.

Lewis WH, Dixit AB, Wedner HJ (1991) Mold aerospora in the Texas Gulf Coast region. *J Allergy Clin Immunol* 87: 182.

Leynaert B, Guilloud-Bataille M, Soussan D, Benessiano J, Guenegou A, Pin I, Neukirch F (2006) Association between farm exposure and atopy, according to the CD14 c-159T polymorphism. *J Allergy Clin Immunol* 118: 658-665.

- Li C-S, Hsu L-Y** (1997) Airborne fungal allergen in association with residential characteristics in atopic and control children in a subtropical region. *Arch Environ Health* 52: 72-79.
- Li S, Westwick J, Poll C** (2003) Transient receptor potential (TRP) channels as potential drug targets in respiratory disease. *Cell Calcium* 33: 551-558.
- Lignell U, Meklin T, Rintala H, Hyvarinen A, Vepsalainen A, Pekkanen J, Nevalainen A** (2008) Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage in the house. *Lett Appl Microbiol* 47: 303-308.
- Linacker C, Smedley J** (2002) Respiratory illness in agricultural workers. *Occup Med* 52: 451-459.
- Lindemuth R, Wirtz N, Lumbsch HT** (2001) Phylogenetic analysis of nuclear and mitochondrial rDNA sequences supports the view that loculoascomycetes (*Ascomycota*) are not monophyletic. *Mycol Res* 105: 1176-1181.
- Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, Davey RP, Roberts IN, Burt A, Koufopanou V, Tsai IJ, Bergman CM, Bensasson D, O'Kelly MJT, van Oudenaarden A, Barton DBH, Bailes E, Nguyen AN, Jones M, Quail MA, Goodhead I, Sims S, Smith F, Blomberg A, Durbin R, Louis EJ** (2009) Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 458: 337-341.
- Liu W-T, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ** (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63: 4516-4522.
- Löffler J, Hebart H, Brauchle U, Schumacher U, Einsele H** (2000) Comparison of plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 38: 3830-3833.
- Lopandic K, Zelger S, Bánszky LK, Eliskases-Lechner F, Prillinger H** (2006) Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol* 23: 341-350.
- López Martínez R, Méndez Tovar LJ** (2007) Chromoblastomycosis. *Clin Dermatol* 25: 188-194.
- Lorenzo LE, Messuti MI** (2005) *Glyphium elatum* (Ascomycota) in Patagonia (Argentina). *Bol Soc Argent Bot* 40: 181-184.
- Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R** (2007) Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 73: 1576-1585.
- Lugauskas A, Griguceviciene A, Nivinskiene O, Selskiene A** (2009) Dangerous microbial pollution in workplace settings. *Ekologija* 55: 58-66.
- Luo W** (1991) Deposition of large particles in the nose and mouth. *Grana* 30: 79-81.

Lustgraaf Bvd (1978) Seasonal abundance of xerophilic fungi and house-dust mites (Acarida: Pyroglyphidae) in mattress dust. *Oecologia* 36: 81-91.

Lyautey E, Teissier S, Charcosset J-Y, Rols J-L, Garabétian F (2003) Bacterial diversity of epilithic biofilm assemblages of an anthropised river section, assessed by DGGE analysis of a 16S rDNA fragment. *Aqua Microb Biol* 33: 217-224.

Lynch CP, Schaberg DR, Kissner DG, Kauffman CA (1981) *Cryptococcus laurentii* lung abscess. *Am Rev Respir Dis* 123: 135-138.

M

Mackay IM (2004) Real-time PCR in the microbiological laboratory. *Clin Microbiol Infect* 10: 190-212.

MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang Y-J, White DC (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* 65: 3566-3574.

MacNeil L, Kauri T, Robertson W (1995) Molecular techniques and their potential application in monitoring the microbiological quality in indoor air. *Can J Microbiol* 41: 657-665.

MacNeill, BH (2011) Studies in *Septoria lycopersici* sp. *Can J Res* 28c: 645-672.

Manian FA, Brischetto MJ (1993) Pulmonary infection due to *Exophiala jeanselmei*: successful treatment with ketoconazole. *Clin Infect Disease* 16: 445-446.

Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genetics* 24: 133-141.

Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen Y-J, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI, Jarvie TP, Jirage KB, Kim J-B, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Kohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc PB, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.

Martin AJ, Landau LI, Phelan PD (1982) Asthma from childhood at age 21: the patient and his disease. *Clin Res Ed* 284: 380-382.

Martin WT, Zhang Y, Willson P, Archer TA, Kinahan C, Barber EM (1996) Bacterial and fungal flora of dust deposits in a pig building. *Occup Environ Med* 53: 484-487.

Martin F, Selosse M-A, Tacon FL (1999) The nuclear rDNA intergenic spacer of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: structural analysis and allelic polymorphism. *Microbiol* 145: 1605-1611.

- Martin K, Rygiewicz P** (2005) Fungal-specific primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol* 5: 28.
- Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R** (2004) The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59: 469-478.
- Matos T, Haase G, Gerrits van den Ende AHG, de Hoog GS** (2003) Molecular diversity of oligotrophic and neurotropic members of the black yeast fungus *Exophiala*, with accent on *E. dermatitidis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 293-303.
- Matsumoto T** (2006) Chromoblastomycosis and Phaeohyphomycosis. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF (Editoren) *Tropical infectious diseases* (Second edition). Principles, pathogens, and practice. Churchill Livingstone, pp. 898-902.
- McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA** (2001a) *The Mycota*. Vol. VII. Part A. Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlin.
- McLaughlin DJ, McLaughlin EG, Lemke PA** (2001b) *The Mycota*. Vol. VII. Part B. Systematics and Evolution. Springer-Verlag, Berlin.
- McNeill JF; Barrie F, Burdet HM, Demoulin V, Hawksworth DL, Marhold K, Nicolson DH, Prado J, Silva PC, Skog JE, Wiersema J, Turland NJ** (2006) International Code of Botany Nomenclature (Vienna Code) [Regnum Vegetabile, Vol. 146]. A.R.G. Canter Verlag, Ruggell.
- Meklin T, Haugland RA, Reponen T, Varma M, Lummus Z, Bernstein D, Wymer LJ, Vesper SJ** (2004) Quantitative PCR analysis of house dust can reveal abnormal mold conditions. *J Environ Monitor* 6: 615-620.
- Melamede RJ** (1985) Automatable process for sequencing nucleotide. US Patent No. US4863849.
- Mendell MJ, Mirer AG, Cheung K, Tong M, Douwes J** (2011) Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiological evidence. *J Environ Health Perspect* 119: 748-756.
- Merz WG, Evans GL, Shadomy S, Anderson S, Kaufman L, Kozinin PJ, MacKenzie DW, Protzman WP, Remington JS** (1977) Laboratory evaluation of serological tests for systemic candidiasis: a cooperative study. *J Clin Microbiol* 5: 596.
- Meyer GH, Prince HE, Raymer WJ** (1983) Airborne fungi – a resurvey. *Ann Allergy* 51: 26-29.
- Middelhoven WJ, Franzen MM** (1986) The yeast flora of ensiled whole-crop maize. *J Sci Food Agric* 37: 855-861.
- Miller JD, Laflamme AM, Sobol Y, Lafontaine P, Greenhalgh R** (1988) Fungi and fungal products in some Canadian houses. *Int Biodeterioration* 24: 103-120.
- Miller JD** (1999) Mycotoxins. In: Francis FJ (Editor) *Encyclopedia of food science and technology*. Wiley, New York, pp. 1698-1706.

- Miller KM, Ming TJ, Schulze AD, Withler RE** (1999) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *BioTechniques* 27: 1016-1030.
- Mitkowski NA, Browning M** (2004) *Leptosphaerulina australis* associated with intensively managed stands of *Poa annua* and *Agrostis palustris*. *Can J Plant Pathol* 26: 193-198.
- Moffat MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farral M, Lathrop M, Cookson WOCM, for the GABRIEL Consortium** (2010) A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 363: 1211-1221.
- Montes MJ, Belloch C, Galiana M, Garcia MD, Andrés C, Ferrer S, Torres-Rodriguez JM, Guinea J** (1999) Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from Antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov.. *System Appl Microbiol* 22: 97-105.
- Morrow MB, Lowe EP** (1943) Molds in relation to asthma and vasomotor rhinitis: a review. *Mycologia* 35: 638-653.
- Mudarri D, Fisk WJ** (2007) Public health and economic impact of dampness and mold. *Indoor Air* 17: 226-235.
- Mulinge SK, Apinis AE** (1969) Occurrence of thermophilous fungi in stored moist barley grain. *Trans Br Mycol Soc* 53: 361-370.
- Müller F-MC, Werner KE, Kasai M, Francesconi A, Chanock SJ, Walsh TJ** (1998) Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *J Clin Microbiol* 36: 1625-1629.
- Müller U, Stenzel W, Köhler G, Werner C, Polte T, Hansen G, Schütze N, Straubinger RK, Blessing M, McKenzie ANJ, Brombacher F, Alber G** (2007) IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 179: 5367-5377.
- Mullins J, Seaton A** (1978) Fungal spores in lung and sputum. *Clin Allergy* 8: 525-533.
- Mullins J** (2001) Microorganisms in outdoor air. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), *Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 1.1: 3-16.
- Murtoniemi T, Nevalainen A, Suutari M, Toivola M, Komulainen H, Hirvonen M-R** (2001) Induction of cytotoxicity and production of inflammatory mediators in RAW264.7 macrophages by spores grown on six different plasterboards. *Inhal Toxicol* 13: 233-247.

Muyzer G, Waal ECD, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.

N

Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Goldsmith CE, Rendall J, Moore JE (2008). Development of novel PCR assay for the identification of the black yeast, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* from adult patients with cystic fibrosis (CF). *J Cystic Fibrosis* 7: 576-580.

National Academy of Sciences (2004) Damp indoor spaces and health. National Academies, Washington, D.C., <http://www.nap.edu>.

Niedoszytko M, Chelminska M, Jassem E, Czestochowska E (2007) Association between sensitization to *Aureobasidium pullulans* (*Pullularia* sp.) and severity of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 98: 153-156.

Niemeier RT, Sivasubramani SK, Reponen T, Grinshpun SA (2006) Assessment of fungal contamination in moldy homes: comparison of different methods. *J Occup Environ Hyg* 3: 262-273.

Nilsson R, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson K, Koljalg U (2006) Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLOS One* 1: e59.

Nilsson R, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K (2008) Intra-specific ITS variability in the kingdom *Fungi* as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinformatics* 4: 193-201.

Nonnenmann MW, Coronado G, Thompson B, Griffith WC, Hanson JD, Vesper SJ, Faustman EM (2012) Utilizing pyrosequencing and quantitative PCR to characterize fungal populations among house dust samples. *J Environ Monit* 14: 2038-2043.

Normand A-C, Vacheyrou M, Sudre B, Heederik D, Piarroux R (2009) Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Appl Environ Microbiol* 75: 7617-7623.

Nunan N, Daniell TJ, Singh BK, Papert A, McNicol JW, Prosser JI (2005) Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils, characterized using molecular techniques. *Appl Environ Microbiol* 71: 6784-6792.

Nyren P, Pettersson B, Uhlen M (1993) Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem* 208: 171-175.

O

O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 71: 5554-5550.

O'Brien M, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT (2007) Quantification and identification of fungal propagules in well-managed baled grass silage and in normal on-farm produced bales. *Anim Feed Sci Technol* 132: 283-297.

O'Connor GT, Walter M, Mitchell H, Kattap M, Morgan WJ, Gruchalla RS, Pongracic JA, Smartt E, Stout JW, Evans R, Crain EF, Burge HA (2004) Airborne fungi in the homes of children with asthma in low-income urban communities: the inner-city asthma study. *J Allergy Clin Immunol* 114: 599-606.

Odds FC (1991) Sabouraud('s) Agar. *J Med Vet Mycol* 29: 355-359.

Ogram A, Saylor GS, Barkay T (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7: 57-66.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989) A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879.

Ortí G, Hare MP, Avise JC (1997) Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Mol Ecol* 6: 575-580.

Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2: 39-50.

Overy DP, Seifert KA, Savard ME, Frisvad JC (2003) Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *Int J Food Microbiol* 88: 69-77.

P

Paton JY (2007) Severe asthma in children. *Pediatr Child Health* 17: 180-187.

Paul VH (1983) Felduntersuchungen zur Resistenz des Winterweizens gegenüber *Asochyta* (*Didymella exitialis*). *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent* 48: 755-759.

Pekkanen J, Hyvärinen A, Haverinen-Shaughnessy U, Korppi M, Ptuts T, Nevalainen A (2007) Moisture damage and childhood asthma: a population-based incident case-control study. *Eur Respir J* 29: 509-515.

Pepys J (1965) Hypersensitivity disease of the lung due to fungi and organic dusts. S. Karger AG, Basel.

Perkin MR, Strachan DP (2006) Which aspects of the farming life style explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* 117: 1374-1380.

- Peters S, Koschinsky S, Schwieger F, Tebbe CC** (2000) Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism based genetic profiles of small subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66: 930-936.
- Pietarinen V-M, Rintala H, Hyvärinen A, Lignell U, Kärkkäinen P, Nevalainen A** (2008) Quantitative PCR analysis of fungi and bacteria in building materials and comparison to culture-based analysis. *J Environ Monit* 10: 655-663.
- Pitkäranta M, Meklin T, Hyvärinen A, Paulin L, Auvinen P, Nevalainen A, Rintala H** (2008) Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR and culture. *Appl Environ Microbiol* 74: 233-244.
- Pitkäranta M, Meklin T, Hyvärinen A, Nevalainen A, Paulin L, Auvinen P, Lignell U, Rintala H** (2011) Molecular profiling of fungal communities in moisture damaged buildings before and after remediation – a comparison of culture-dependent and culture-independent methods. *BMC Microbiol* 11: 235.
- Pitt JI** (1980) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, New York, pp. 634 pp.
- Pitt JI, Cruickshank RH, Leistner L** (1986) *Penicillium commune*, *Penicillium camembertii*, the origin of white cheese moulds, and the production of cyclopiazonic acid. *Food Microbiol* 3: 363-371.
- Pitt JI, Samson RA, Frisvad JC** (2000) List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: Samson RA, Pitt JI (Editoren) Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Harwood Publishers, Amsterdam, pp. 9-49.
- Potenza L, Cafiero MA, Camarda A, La Salandra G, Cucchiari L, Dachà M** (2009) Characterization of *Dermanyssus gallinae* (Acarina: Dermanyssidae) by sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Vet Res Commun* 33: 611-628.
- Powell SM, Bowman JP, Snape I, Stark JS** (2003) Microbial community variation in pristine and polluted nearshore Antarctic sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 45: 135-145.
- Prasongsuk S, Sullivan RF, Kuhirun M, Eveleigh DE, Punnapayak H** (2005) Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. *World J Microb Biot* 21: 393-398.
- Prosser JI** (2002) Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil* 244: 9-17.
- Punithalingam E** (1979) Garminicolous *Asochyta* species. *Mycol Papers* 142, Commonwealth Mycological Society, Kew.

Q

Quinlan AR, Stewart DA, Stromberg MP, Marth GT (2008) Pyrobayes: an improved base caller for SNP discovery in pyrosequences. *Nature Methods* 5: 179-181.

R

Rack K, Butin H (1984) Experimenteller Nachweis nadelbewohnender Pilze bei Koniferen. *Eur J Forest Pathol* 14: 302-310.

Radon K, Peters A, Praml G, Ehrenstein V, Schulze A, Hehl O, Nowak D (2004) Livestock odours and quality of life of neighbouring residents. *Ann Agric Environ Med* 11: 59-62.

Radon K, Schulze A, Nowak D (2006) Inverse association between farm animal contact and respiratory allergies in adulthood: protection, underreporting or selection? *Allergy* 61: 443-446.

Ramana KV, Kumar MV, Rao SD, Akhila R, Sandhya, Shruthi P, Pranuthi M, Krishnappa M, Anand K (2012) Pulmonary cryptococcosis secondary to bronchial asthma presenting as type 1 respiratory failure – a case report with review of literature. *Virology* 1: 1-3.

Rand TG, Giles S, Flemming J, Miller JD, Puniani E (2005) Inflammatory and cytotoxic responses in mouse lungs exposed to purified toxins from building isolated *Penicillium brevicompactum* Dierckx and *Penicillium chrysogenum* Thom. *Toxicol Sci* 87: 213-222.

Ranjard L, Poly F, Lata J-C, Mougel C, Thioulouse J, Nazaret S (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol* 67: 4479-4487.

Raper KB, Thom C (1949) *A Manual of the Penicillia*. Williams & Wilkins, Baltimore 1949: S. 359–364.

Reboux G, Piarroux R, Mauny F, Madroszyk A, Millon L, Bardouet K, Dalphin J-C (2001) Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1534-1539.

Reboux G, Reiman M, Roussel S, Taattola K, Millon L, Dalphin J-C, Piarroux R (2006) Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage and flour on Finish and French farms. *Ann Agric Environ Med* 13: 267-273.

Reed JA, Hemann BA, Alexander JL, Brigati DJ (1993) Immunomycology: rapid and specific immunocytochemical identification of fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded material. *J Histochem Cytochem* 41: 1217-1221.

Ren P, Jankun TM, Leaderer BP (1999) Comparisons of seasonal fungal prevalence in indoor and outdoor air and in house dusts of dwellings in one North-east American county. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 9: 560-568.

- Renker C, Blanke V, Börstler B, Heinrichs J, Buscot F** (2004) Diversity of *Cryptococcus* and *Dioszegia* yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. *FEMS Yeast Res* 4: 597-603-
- Reponen T, Lockey J, Bernstein DI, Vesper SJ, Levin L, Khurana Hershey GK, Zheng S, Ryan P, Grinshpun SA, Villareal M, LeMasters G** (2012) Infant origins of childhood asthma associated with specific molds. *J Allergy Clin Immunol* 130: 639-644.
- Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E, ALEX study team** (2001) Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358: 1129-1133.
- Rintala H, Pitkäranta M, Täubel M** (2012) Microbial communities associated with house dust. *Adv Appl Microbiol* 78: 75-120.
- Romanent-Manent S, Charpin D, Magnan A, Lanteaume A, Vervloet D, and the EGEA Cooperative Group** (2002) Allergic vs non-allergic asthma: what makes the difference? *Allergy* 57: 607-613.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P** (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 242: 84-89.
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P** (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363-365.
- Ronaghi M** (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11: 3-11.
- Rooney AP, Ward TJ** (2005) Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. *PNAS* 102: 5084-5089.
- Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Harry M** (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl Soil Ecol* 18: 47-60.
- Rossmann SN, Cernoch PL, Davis JR** (1995) Dematiaceous fungi are an increasing cause of human disease. *Clin Infect Dis* 22: 73-80.
- Rothberg JM, Leamon JH** (2008) The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol* 26: 1117-1124.
- Roussel S, Reboux G, Dalphin J-C, Bardouet K, Millon L, Piarroux R** (2004) Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occup Environ Med* 61: e3.
- Roux C** (1986) *Leptosphaerulina chartarum* sp. nov., the teleomorph of *Pithomyces chartarum*. *Transactions of the British Mycological Society* 86: 319-323.

Rozera G, Abbate I, Bruselles A, Vlassi C, D'Offizi G, Narciso P, Chillemi G, Prosperi M, Ippolito G, Capobianchi MR (2009) Massively parallel pyrosequencing highlights minority variants in the hiv-1 env quasispecies deriving from lymphomonocyte subpopulations. *Retrovirology* 6: 15.

Ruiz-Herrera J (1992) Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. CRC Press, Boca Raton, FL.

Rusk N (2011) Torrents of sequence. *Nat Methods* 8: 44.

Ryberg M, Nilsson RH, Kristiansson E, Töpel M, Jacobsson S, Larsson E (2008) Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: A case study in *Inocybe* (*Basidiomycota*). *BMC Evol Biol* 8: 50-64.

Rydjord B, Marton JH, Stromsnesw H, Granum B, Bollez R, Nystad W, Hetland G (2008) Mould-specific immunoglobulin antibodies quantified by flow-cytometry reflect mould exposure in Norwegian children. *Clin Exp Allergy* 38: 430-437.

S

Sabouraud R (1892) Contribution a l'étude de la trichophytie humaine. *Ann Dermatol* 3: 1061-1087.

Sahakian NM, Park JH, Cox-Ganser JM (2008) Dampness and mold in the indoor environment: implications of asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 28: 485-505.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

Sakula A (1984) Sir John Floyer's *A treatise of the asthma* (1698). *Thorax* 39: 248-254.

Salkin IF, Martinez JA, Kemna ME (1986) Opportunistic infection of the spleen caused by *Aureobasidium pullulans*. *J Clin Microbiol* 23: 828-831.

Samson RA, van Reenen-Hoekstra ES (1988) Identification of the common food-borne fungi. In: Samson RA, van Reenen-Hoekstra ES (Editoren) Introduction to food-borne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (2002) Introduction to food- and airborne fungi, 6th edition, Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

Samson RA, Houbraken J (2001) Isolation and identification of microorganisms. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 4.2: 247-266.

Samson RA, Varga J (2009) What is a species in *Aspergillus*. *Med Mycol* 47: S13-S20.

Samuels T, Morava-Protzner I, Youngson B, Huang SN (1989) Calcification in bronchopulmonary sequestration. *Can Assoc Radiol J* 40: 106-107.

- Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD** (1995) Molecular probes for diagnosis and fungal infections. *J Clin Microbiol* 33: 2913-2919.
- Sanger F, Coulson AR** (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-448.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74: 5463-5467.
- Saunte DM, Tarazooie B, Arendrup MC, de Hoog GS** (2012) Black-yeast like fungi in skin and nail: it probably matters. *Mycoses* 55: 161-167.
- Sawamura K** (1976) Studies on apple *Alternaria* blotch caused by *Alternaria mali* Roberts. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 42: 228-231.
- Sayer ST, Lauren DR** (1991) *Fusarium* infection in New Zealand grain. *NZ J Crop Horticultural Sci* 19: 143-148.
- Schmalenberger A, Schwieger F, Tebbe CC** (2001) Effects of primers hybridizing to different evolutionary conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Appl Environ Microbiol* 67: 3557-3563.
- Schnürer J** (1993) Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl Environ Microbiol* 59: 552-555.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium** (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *PNAS* 109: 6241-6246.
- Schram-Bijkerk D, Doekes G, Douwes J, Boeve M, Riedler J, Ublagger E, von Mutius E, Benz MR, Pershagen G, van Hage M, Scheynius A, Braun-Fahrländer C, Waser M, Brunekreef B** (2005) Bacterial and fungal agents in house dust and wheeze in children. *Clin Exp Allergy* 35: 1272-1278.
- Schwab CJ, Cooley JD, Jumper CJ, Graham SC, Straus DC** (2004) Allergic inflammation produced by a *Penicillium chrysogenum* conidia-associated allergen extract in a murine model. *Allergy* 59: 758-765.
- Schwieger F, Tebbe CC** (1998) A new approach to utilize PCR-single stranded conformation polymorphism for 16S rDNA gene-based microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 64: 4870-4876.
- Senkpiel K, Kurowski V, Ohgke H** (1996) Raumlufuntersuchungen schimmelpilzbelasteter Wohn- und Aufenthaltsräume bei ausgewählten Patienten mit Asthma bronchiale (unter besonderer Berücksichtigung der Bewertungsproblematik). *ZBI Hyg Umweltmed* 198: 191-203.
- Serra-Batilles J, Plaza V, Morejon E, Comella A, Bruges J** (1998) Costs of asthma according to the degree of severity. *Eur Respir J* 12: 1322-1326.

- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM** (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332.
- Shen H-D, Liaw S-F, Lin W-L, Ro L-H, Yang H-L, Han S-H** (1995) Molecular cloning of cDNA coding for the 68 kDa allergen of *Penicillium notatum* using monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy* 25: 350-356.
- Shen H-D, Lin W-L, Tsai J-J, Liaw S-F, Han S-H** (1996) Allergenic components in three different species of *Penicillium*: cross-reactivity among major allergens. *Clin Exp Allergy* 26: 445-451.
- Shendell DG, Mizzan SS, Yamamoto N, Peccia J** (2012) Associations between quantitative measures of fungi in home floor dust and lung function among older adults with chronic respiratory disease. *J Asthma* 46: 502-509.
- Shimazu K, Ando M, Sakata T, Yoshida K, Araki S** (1984) Hypersensitivity pneumonitis induced by *Trichosporon cutaneum*. *Amer Rev Resp Dis* 130: 407-411.
- Simonet P, Grosjean M-C, Misra AK, Nazaret S, Cournoyer B, Normand P** (1991) *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 57: 3278-3286.
- Simon-Nobbe B, Denk U, Pöll V, Rid R, Breitenbach M** (2008) The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 145: 58-86.
- Simspon DR, Rezanoor HN, Parry DW, Nicholson P** (2000) Evidence of differential host preference in *Microdochium nivale* var. *majus* and *Microdochium nivale* var. *nivale*. *Plant Pathol* 49: 261-268.
- Singh J, Schwartz DA** (2005) Endotoxin and the lung: insight into the host-environment interaction. *J Allergy Clin Immunol* 115: 330-333.
- Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kropf S, Ulrich A, Tebbe CC** (2007) Bacterial diversity soil assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *J Microbiol Methods* 69: 470-479.
- Smiley RW, Dernoeden PH, Clarke BB** (1992) Infectious foliar diseases. In: Smiley RW, Dernoeden PH, Clarke BB (Editoren) *Compendium of turfgrass diseases*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, pp. 11-37.
- Smit E, Leeflang P, Glandorf B, van Elsas JD, Wernars K** (1999) Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65: 2614-2621.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ** (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored „rare biosphere“. *PNAS* 103: 12115-12120.

- Somerville W, Thibert L, Schwartzman K, Behr MA** (2005) Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment. *J Clin Microbiol* 43: 2996-2997.
- Sorenson WG** (2001) Occupational respiratory disease – organic dust toxic syndrome. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), *Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 3.3: 143-155.
- Stackebrandt E, Goebel BM** (1994) Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44: 846-849.
- Stark PC, Celedón JC, Chew GL, Ryan LM, Burge HA, Muilenberg ML, Gold DR** (2005) Fungal levels in the home and allergic rhinitis by 5 years of age. *Environ Health Perspect* 113: 1405-1409.
- Strachan DP** (1989) Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 299: 1259-1260.
- Strachan DP** (2000) Family size, infection and atopy: the first decade of the “hygiene hypothesis”. *Thorax* 55: S2-10.
- Sugita T, Nishikawa A, Shinoda T, Kume H** (1995) Taxonomic position of deep-seated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from trichosporonosis patients. *J Clin Microbiol* 33: 1368-1370.
- Sullivan S, Elixhauser A, Buist AS, Luce BR, Eisenberg J, Weiss KB** (1996) National asthma education and prevention program working group report on the cost effectiveness of asthma care. *Am J Respir Crit Care Med* 154: S84-95.
- Summerbell RC** (2001) Respiratory tract infections caused by indoor fungi. In: Flannigan B, Samson RA, Miller JD (Editoren), *Microorganisms in home and indoor work environment: diversity, health impacts, investigation and control*. Taylor & Francis, New York, USA. Chapter 3.5, pp. 195-215.
- Sunnucks P, Wilson ACC, Behereharay LB, Zenger K, French J, Taylor AC** (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 9: 1699-1710.
- Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, Knox RB** (1992) Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet* 339: 569-572.
- Suzuki MT, Giovannoni SJ** (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62: 625-630.

T

Takahashi T (1997) Airborne fungal colony-forming units in outdoor and indoor environments in Yokohama, Japan. *Mycopathol* 139: 23-33.

Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *Int J Sys Evol Microbiol* 53: 1187-1194.

Talgo V, Chastagner G, Thomsen IM, Cech T, Riley K, Lange K, Klemsdal SS, Stensvand A (2010) *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.). *Fungal Biol* 114: 545-554.

Taskinen T, Meklin T, Nousiainen M, Husman T, Nevalainen A, Korppi M (1997) Moisture and mold problems in schools and respiratory manifestations in school-children: clinical and skin test findings. *Acta Paediatr* 86: 1181-1187.

Thorn G (1997) The fungi in soil. In: van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH (Editoren) *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp. 63-127.

Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, Marsh TL, Flynn SJ (1999) Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl Soil Ecol* 13: 109-122.

To T, Stanojevic S, Moores G, Gershon AS, Bateman ED, Cruz AA, Boulet L-P (2012) Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health* 12: 204.

Toivola M, Alm S, Nevalainen A (2004) Viable fungi and bacteria in personal exposure samples in relation to microenvironments. *J Environ Monit* 6: 113-120.

Tóth B, Csósz M, Dijksterhuis J, Frisvad JC, Varga J (2007) *Pithomyces chartarum* as a pathogen of wheat. *J Plant Pathol* 89: 405-408.

Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T (2000) Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur J Clin Invest* 30: 511-518.

U

Uijthof JMJ (1996) Relationships within the black yeast genus *Exophiala* based on ITS1 sequences. *Mycol Res* 100: 1265-1271.

Urubschurov V, Janczyk P, Pieper R, Souffrant WB (2008) Biological diversity of yeasts in the gastrointestinal tract of weaned piglets kept under different farm conditions. *FEMS Yeast Res* 8: 1349-1356.

V

van Bronswijk JEMH (1981) House dust biology of allergists, acarologists and mycologists. *Zoelmond*, 33-45, 151-179.

van Burik JH, Schreckhise RW, Myerson D, White TC, Bowden RA (1997) Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. Abstract F-12, p. 262. In: Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

van Elsas JD, Frois-Duarte G, Keijzer-Wolters A, Smit E (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* 43: 133-151.

van Guilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44: 619-626.

van Strien RT, Engel E, Holst O, Bufe A, Eder W, Waser M, Braun-Fahrländer C, Riedler J, Nowak D, von Mutius E, the ALEX study team (2004) Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health. *J Allergy Clin Immunol* 113: 860-867.

Vartiainen E, Petays T, Haahtela T, Jousilahti P, Pekkanen J (2002) Allergic diseases, skin-prick test responses, and IgE levels in North Karelia, Finland, and the Republic of Karelia, Russia. *J Allergy Clin Immunol* 109: 643-648.

Velegraki A, Kambouris ME, Skiniotis G, Savala M, Mitroussia-Ziouva A, Legakis NJ (1999) Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 23: 303-312.

Vesper SJ, McKinstry C, Yang C, Haugland RA, Kercksmar CM, Yike I, Schluchter MD, Kirchner HL, Sobolewski J, Allan, TM, Dearborn DG (2006) Specific mold associated with asthma in water-damaged homes. *J Occup Environ Med* 48: 852-858.

Vesper SJ, McKinstry C, Ashley P, Haugland RA, Yeatts K, Bradham K, Svendsen E (2007a) Quantitative PCR analysis of molds in the dust from homes of asthmatic children in North Carolina. *J Environ Monit* 9: 826-830.

Vesper SJ, McKinstry C, Haugland RA, Wymer L, Bradham K, Ashley P, Cox D, Dewalt G, Friedman W (2007b) Development of an Environmental Relative Moldiness Index for US homes. *J Occup Environ Med* 49: 829-833.

Vicente VA, Attili-Angelis D, Pie MR, Queiroz-Telles F, Cruz LM, Najafzadeh MJ, de Hoog GS, Zhao J, Pizzirani-Kleiner A (2008) Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Stud Mycol* 61: 137-144.

Vilgalys R, Gonzalez D (1990) Organisation of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current Gen* 18: 277-280.

Vilgalys R (Duke University) Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>; heruntergeladen am 04.12.2012.

Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnosis. *Clin Chem* 55: 641-658.

Vogel K, Blümer N, Korthals M, Mittelstädt J, Garn H, Ege M, von Mutius E, Gatermann S, Bufe A, Goldmann T, Schwaiger K, Renz H, Brandau S, Bauer J, Heine H, Holst O (2008) Animal shed *Bacillus licheniformis* spores possess allergy-protective as well as inflammatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 122: 307-312.

von Berg A, Koletzko S, Grübl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann H-E, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D, for the German Infant Nutritional Intervention Study Group (2003) The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: The German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial. *J Allergy Clin Immunol* 111: 533-540.

von Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Böhm O, von Kries R (2000) Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 30: 187-193.

von Mutius E, Braun-Fahrländer C, Schierl R, Riedler J, Ehlemanns S, Maisch S, Waser M, Nowak D (2001) Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of asthma. *Clin Exp Allergy* 30: 1230-1234.

von Mutius E, Vercelli D (2010) Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 10: 861-868.

von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 21: 213-229.

W

Wang L, Yokoyama K, Miyaji M, Nishimura K (2001) Identification, classification, and phylogeny of the pathogenic species *Exophiala jeanselmei* and related species by mitochondrial cytochrome b gene analysis. *J Clin Microbiol* 39: 4462-4467.

Waser M, Michels KB, Bieli C, Flöistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrländer C and the PARSIFAL Study team (2006) Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37: 661-670.

Wassenaar DPJ (1988) Effectiveness of vacuum cleaning and wet cleaning in reducing house-dust mites, fungi and mite allergen in a cotton carpet: a case study. *Exp Appl Acarol* 4: 53-62.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Editoren) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 315-322.

Whittaker RH (1972) Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 21: 213-251.

Wichmann HE (1995) Environment, life-style and allergy: the German answer. *Allergology* 4: 315-316.

Wicklow DT, Shannon GT, Shotwell OL (1981) Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* QM 432 used in fungus resistance tests for USA military specifications. *Mycopathologia* 74: 25-28.

Wilson AM, Luo W, Miller JD (2009) Using human sera to identify a 52-kDa exo-antigen of *Penicillium chrysogenum* and implications of polyphasic taxonomy of anamorphic ascomycetes in the study of antigenic proteins. *Mycopathol* 168: 213-226.

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS* 87: 4576-4579.

Woodcock AA, Steel N, Moore CB, Howard SJ, Custovic A, Denning DW (2006) Fungal contamination of bedding. *Allergy* 61: 140-142.

Wooley AT, Mathies RA (1995) Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. *Anal Chem* 67: 3676-3680.

World Health Organization (2004) WHO factsheet 206: bronchial asthma.

Wu Z, Wang X-R, Blomquist G (2002) Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi. *J Environ Monit* 4: 377-382.

Wynn JP, Kendrick A, Ratledge C (1997) Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme. *Lipids* 32: 605-610.

Y

Yamamoto N, Shendell DG, Peccia J (2011) Assessing allergenic fungi in house dust by floor wipe sampling and quantitative PCR. *Indoor Air* 21: 521-530.

Z

Zachow C, Berg C, Müller H, Meincke R, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS, Kubicek CP, Berg G (2009) Fungal diversity in the rhizosphere of endemic plant species of Tenerife (Canary Islands): relationship to vegetation zones and environmental factors. *The ISME Journal* 3: 79-92.

Zalar P, de Hoog GS, Schroers H-J, Frank JM, Gunde-Cimerman (2005) Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 311-328.

Zalar P, Nowak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N (2011) Dishwashers – a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fun Biol* 115: 997-1007.

Zeng JS, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Harrak MJ, de Hoog GS (2007) Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *J Clin Microbiol* 45: 3713-3720.

Zhao M (2012) Development of a house dust mite model of mixed allergic airway inflammation and analysis of allergyprotective effects of *Staphylococcus sciuri*. Dissertation rer. nat., Philipps-Universität Marburg.

Zhou J, Brunns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62: 316-322.

Zock J-P, Plana E, Jarvis D, Antó JM, Kromhout H, Kennedy SM, Künzli N, Villani S, Olivieri M, Torén K, Radon K, Sunyer J, Dahlmann-Hoglund A, Norbäck D, Kogevinas M (2007) The use of household cleaning sprays and adult asthma: an international longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med* 176: 735-741.

10 Anhang

10.1 Anhang A: Tabellen

10.1.1 Anhang A1: Bestimmung der Ähnlichkeiten von SSCP-Bandenprofilen (Pearson Korrelations-Koeffizient (%)) von jeweils einer Staubprobe unterschiedlicher Herkunft)

10.1.1.1 Vergleichsanalyse innerhalb eines Polyacrylamidgels (Intragel-Variation)

10.1.1.1.1 Hühnerstallstaubprobe (Intragel-Variation)

Tabelle 41: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Hühnerstall) innerhalb eines Polyacrylamidgels (Intragel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Profil 5
Profil 1	100				
Profil 2	98,93	100			
Profil 3	98,79	97,78	100		
Profil 4	97,95	96,85	98,51	100	
Profil 5	98,15	97,43	97,94	99,65	100
Mittelwert	98,23 [SD = 0,78]				

SD = Standardabweichung

10.1.1.1.2 Schweinestallstaubprobe (IntrageI-Variation)

Tabelle 42: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Schweinestall) innerhalb eines Polyacrylamidgels (IntrageI-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Profil 5
Profil 1	100				
Profil 2	99,52	100			
Profil 3	98,69	98,91	100		
Profil 4	98,66	97,76	97,91	100	
Profil 5	97,01	97,87	95,55	95,78	100
Mittelwert	97,77 [SD = 1,31]				

SD = Standardabweichung

10.1.1.1.3 Kuhstallstaubprobe (IntrageI-Variation)

Tabelle 43: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Kuhstall) innerhalb eines Polyacrylamidgels (IntrageI-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Profil 5
Profil 1	100				
Profil 2	99,65	100			
Profil 3	97,80	98,79	100		
Profil 4	97,68	97,73	97,59	100	
Profil 5	97,91	97,33	95,85	96,24	100
Mittelwert	97,66 [SD = 1,09]				

SD = Standardabweichung

10.1.1.1.4 Matratzenstaubprobe (Intragel-Variation)

Tabelle 44: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Matratze) innerhalb eines Polyacrylamidgels (Intragel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Profil 5
Profil 1	100				
Profil 2	93,07	100			
Profil 3	84,53	75,89	100		
Profil 4	94,49	89,33	95,60	100	
Profil 5	85,49	77,78	83,38	81,54	100
Mittelwert	86,11 [SD = 6,86]				

SD = Standardabweichung

10.1.1.2 Vergleichsanalyse zwischen Polyacrylamidgelen (Intergel-Variation)

10.1.1.2.1 Schweinestallstaubprobe (Intergel-Variation)

Tabelle 45: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Schweinestall) zwischen Polyacrylamidgelen (Intergel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 4)

	Gel1-1	Gel1-2	Gel1-3	Gel1-4	Gel1-5	Gel2-1	Gel2-2	Gel3-1	Gel3-2	Gel4
Gel1-1	100									
Gel1-2	99,52	100								
Gel1-3	98,69	98,91	100							
Gel1-4	98,66	97,76	97,91	100						
Gel1-5	97,01	97,87	95,55	95,78	100					
Gel2-1	81,85	78,05	80,43	74,03	79,86	100				
Gel2-2	86,34	81,82	88,62	85,35	86,47	90,19	100			
Gel3-1	87,51	82,46	87,74	84,36	85,60	88,02	94,85	100		
Gel3-2	80,53	76,53	81,26	75,71	78,92	93,09	91,98	92,00	100	
Gel4	86,60	81,55	87,69	85,25	85,59	76,77	94,79	95,58	94,53	100
MW	88,13 [SD = 7,24]									

SD = Standardabweichung; MW: Mittelwert; Gel 1: Werte von Intragel-Vergleich (Tabelle 42); Gel2 / 3: Doppelauftrag der Probe

10.1.1.2.2 Kuhstallstaubprobe (Intergel-Variation)

Tabelle 46: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Kuhstall) zwischen Polyacrylamidgelen (Intergel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Gel1-1	Gel1-2	Gel1-3	Gel1-4	Gel1-5	Gel2	Gel3	Gel4	Gel5
Gel1-1	100								
Gel1-2	99,65	100							
Gel1-3	97,80	98,79	100						
Gel1-4	97,68	97,73	97,59	100					
Gel1-5	97,91	97,33	95,85	96,24	100				
Gel2	88,81	87,85	84,27	86,08	87,65	100			
Gel3	93,44	84,77	95,10	94,85	91,69	89,97	100		
Gel4	94,52	94,32	92,32	91,52	92,19	86,39	91,63	100	
Gel5	96,85	95,91	93,11	94,08	96,66	89,92	93,09	94,49	100
MW	93,51 [SD = 3,98]								

SD = Standardabweichung; MW: Mittelwert; Gel 1: Werte von Intragel-Vergleich (Tabelle 43)

10.1.1.2.3 Matratzenstaubprobe (Intergel-Variation)

Tabelle 47: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Matratze) zwischen Polyacrylamidgelen (Intergel-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Gel1-1	Gel1-2	Gel1-3	Gel1-4	Gel1-5	Gel2	Gel3	Gel4	Gel5
Gel1-1	100								
Gel1-2	93,07	100							
Gel1-3	84,53	75,89	100						
Gel1-4	94,49	89,33	95,60	100					
Gel1-5	85,49	77,78	83,38	81,54	100				
Gel2	80,48	70,59	84,09	82,59	87,77	100			
Gel3	79,57	64,33	83,29	80,21	81,89	93,64	100		
Gel4	71,89	59,26	75,97	72,69	78,25	80,11	86,75	100	
Gel5	77,49	63,47	81,64	78,53	84,15	83,05	88,73	96,33	100
MW	81,34 [SD = 8,64]								

SD = Standardabweichung; MW: Mittelwert; Gel 1: Werte von Intragel-Vergleich (Tabelle 44)

10.1.1.3 Vergleichsanalyse zwischen verschiedenen DNA-Extraktionstagen (Intertag-Variation)

10.1.1.3.1 Hühnerstallstaubprobe (Intertag-Variation)

Tabelle 48: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Hühnerstall) von verschiedenen DNA-Extraktionstagen auf einem Polyacrylamidgel (Intertag-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Tag 1	100				
Tag 2	96,55	100			
Tag 3	95,07	94,03	100		
Tag 4	93,71	85,25	85,77	100	
Tag 5	94,54	89,03	86,30	94,95	100
Mittelwert	91,52 [SD = 4,42]				

SD = Standardabweichung

10.1.1.3.2 Schweinestallstaubprobe (Intertag-Variation)

Tabelle 49: Vergleich von SSCP-Bandenprofilen von einer Staubprobe (Schweinestall) von verschiedenen DNA-Extraktionstagen auf einem Polyacrylamidgel (Intertag-Variation; Pearson Korrelations-Koeffizient (%); n = 5)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Tag 1	100				
Tag 2	98,99	100			
Tag 3	98,00	98,57	100		
Tag 4	97,37	95,95	96,61	100	
Tag 5	91,77	94,53	90,53	82,93	100
Mittelwert	94,53 [SD = 4,95]				

SD = Standardabweichung

10.1.2 Anhang A2: Darstellung erhaltener Sequenzen aus Sanger- und Parallelsequenzierung

10.1.2.1 Adaption der PCR-SSCP-Basismethode: Identifikation von DSMZ-Referenzstämmen auf Speziesebene in Abhängigkeit des gewählten Primerpaares

Tabelle 50: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Aspergillus versicolor* (DSM 1943) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
0817/1536	TTAGCATGGAATAATrGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGGTTGGTTTCTAGGAC CGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTCAGAG GTGAAATTCTTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGA TGTTTTTCATTAATCAGGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCG TCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGGCGTTTCTATGA TGACCCGCTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTA TGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACAAGGCGTG GAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACAA ATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATG GCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGA CCTCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGCGTCCGCGGGCCGCTGGCTTCTTAGGG GGACTATCGGCTCAAGCCGATGGAAGTGC GCGGCAATAACAGGTCTGTGATGC CCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGGGCCAGCGAGTACA TCACCTTGGCCGAGAGGGCCCGGTAATCTTGTTAAACCCTGTCGTGCTGGGGA TAGAGCATTGCAAT
NS7/NS8	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCT ACACTGACAGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCT TGTTAAACCCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGA GGAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATTACGTCCCTGCCCT TTGTACACACCGCCCGTGCCTACTACCGATTGAATGGCTCGGTGAGGCCCTTCG GACTGGCGCAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCCGCGCCGAAAGTTGGTCAA ACCCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT GCGGA
U1/U2	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGGCCCTCGGGGTTGAG CCAGCATTGCTGCTGGTGTACTTCCCGGGGCGGGCCAGCGTCGGTTCGGG CGGCCGGTCAAAGGCCCCAGGAATGTATCGTCCTCCGGGACGTCTTATAGCCT GGGGTGCAATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCT GGCGTAATGGTTGCAAACGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTC
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGC GCCAACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCT CTCGGGGGCGAGCCGCCGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCA GTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTC CGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT CAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGG GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGG TCGTGTCGTCGCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGC CGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGG GCGCCAGCCGACGTCCAACCATTTTTTCTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Fortsetzung Tabelle 50: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Aspergillus versicolor* (DSM 1943) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
ITS1F/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTG CGGAAGGATCATTACTGAGTGC GGGCTGCCTCCGGGCGCCCAACCTCCCACCC GTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCG CCGGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATA AAATCAGTCAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTC TTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATCGCTGTCCGAGCG TCAATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGTCTCCCGGGGG GGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGG GGCTTTGTACCCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGGGCGCCAGCCGACGTCCAA CCATTTTTTCTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA
Fun18sf/ITS4	TTGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATT ACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTGCTACTACCGATTGAATGGCTCG GTGAGGCCTTCGGACTGGCGCAGGAGGTTGGCAACGACCCCCCGCGCCGG AAAGTTGGTCAAACCCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGTTTTCC GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGC GGGCTGCCTCCGGGCGC CCAACCTCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCT CGGGGGCGAGCCGCGGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGT CTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGC ATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTC GTCGTCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGTCCG GTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGATTTAGGGCCGGCCGGG GCCAGCCGACGTCCAACCATTTTTTCTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Tabelle 51: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Cladosporium herbarum* (DSM 63422) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
0817/1536	TTAGCATGGAATAATrGAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTTGTTGGTTTCTAGGAC CGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCATCAGTATTCAATCGTCAGAGG TGAAATTCTTGGATTGATTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGATG TTTTCATTAATCAGTGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTC GTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGTGTTAGTATTTTTG ACCCGTTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATG GTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGA GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACACAAT AAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGGTGGTGGTGCATGGC CGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGACC TTAACCTGCTAAATAGCCAGGCCCGCTTTGGCGGGTCCCGGCTTCTTAGAGG GACTATCGGCTCAAGCCGATGGAAGTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCC CTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGACAGAGCCAACGAGTTCAT TTCCTTAGCCGAAAGGTTTGGGTAATCTTGTTAACTCTGTCGTGCTGGGGATA GAGCATTGCAAT

Fortsetzung Tabelle 51: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Cladosporium herbarum* (DSM 63422) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
NS7/NS8	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCT ACACTGACAGAGCCAACGAGTTCATTTCTTAGCCGAAAGTTTGGGTAATCTT GTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG GAATGCCTAGTAAGCGCATGTCATCAGCATGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTT GTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCGGTGAGGCCCTTCGGA CTGGCCAGGGAGGTGCGCAACGACCACCCAGGGCCGAAAAGTTGGTCAAAC CCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGC GGA
U1/U2	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGATTGCAACCAGACTTGCTCGCGGTGTTCCG CCGGTCTTCTGACCGGTCTACTCGCCGCGTTGCAGGCCAGCATCGTCTGGTGC CGCTGGATAAGACTTGAGGAATGTAGCTCCCTCGGGAGTGTTATAGCCTCTTGT GATGCAGCGAGCGCCGGGCGAGGTCCGCGCTTCGGCTAGGATGCTGGCGTAA TGGTCGTAATCCGCCCGTCTTCAAACACGGACCAAGGAGTC
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTACGGCCGG GATGTTCCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCT TCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCT GAGTAACTTAATTAATAAATTAATAAATTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGC CTGTTTCGAGCGTCATTTCAACACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGT CCGCCGCGTGCCTCAAATCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTG GAACTATTTCGCTAAAGGGTGTTCCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTT CTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAGCGGAGGA
ITS1F/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTG CGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTACGGCCGGGATGTTCCATAACCCTT TGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTC CGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTTAATTA TAAATTAATAAATTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT TTCACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTC AAATCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGAAACTATTTCGCTAA AGGGTGTTCCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTC GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
Fun18sf/ITS4	TTGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCATGTCATCAGCATGCGTTGATT ACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCG GTGAGGCCCTTCGGACTGGCCCAGGGAGGTGCGCAACGACCACCCAGGGCCGG AAAGTTGGTCAAACCCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCC GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTACGGCCGGGAT GTTCCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCG GGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAG TAACTTAATTAATAAATTAATAAATTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCT GTTTCGAGCGTCATTTCAACACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCC GCCGCGTGCCTCAAATCGTCCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGA AACTATTTCGCTAAAGGGTGTTCCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCT AAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA GCGGAGGA

Tabelle 52: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Eurotium amstelodami* (DSM 62629) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
0817/1536	TTAGCATGGAATAATrGAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTGGTTTCTAGGAC CGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTCAGAG GTGAAATTCTTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTCCGCAAGGA TGTTTTTCAATTAATCAGGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCG TCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGGCGGTGTTTCTATAA TGACCCGCTCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTA TGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACAAGGCGTG GAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACAA AATAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATG GCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGA CCTCGGCCCTTAAATAGCCCCGGTCCGCATTTGCGGGCCGCTGGCTTCTTAGGG GGATATCGGCTCAAGCCGATGGAAGTGC GCGGCAATAACAGGTCTGTGATGC CCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGACAGGGCCAGCGAGTACA TCACCTTGCCGAGAGGTCCGGGTAATCTTGTTAAACCCTGTCGTGCTGGGGA TAGAGCATTGCAAT
NS7/NS8	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCT ACACTGACAGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGTCCGGGTAATCT TGTTAAACCCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGA GGAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATTACGTCCCTGCCCT TTGTACACACCGCCCGTCCGCTACTACCGATTGAATGGCTCGGTGAGGCCTTCG GACTGGCTCCAGGGGGTTGGCAACGACCCCCAGAGCCGGAAAGTTGGTCAA ACCCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCT GCGGA
U1/U2	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGC GACCAGACTCGCTTCCGGGGTTCAG CCGGCTTTCCGGCCGGTGTACTTCCCCGGGGGCGGGCCAGCGTCCGTTTGGG CGGCCGGTCAAAGGCCCTGGAATGTAACGCCTCTCGGGGCGCCTTATAGCCA GGGGTGTGATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCCGGCACGGACGCT GGCATAATGGTCGTAAACGACCCGCTTTGAAACACGGACCAAGGAGTC
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGC GGGCCCTCTGGGTCC AACCTCCCATCCGTGTCTATCTGTACCCTGTTGCTTCCGGCGTGGCCACGGCCC GCCGGAGACTAACATTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTAGTTA ACAATCGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGT CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGC GTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGCAAC GGGACGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCCTCGAGCGTAT GGGGCTTTGTCACCCGCTCCCGTAGGTCCAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCA ATCTTTTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCGGAGGA
ITS1F/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTG CGGAAGGATCATTACCGAGTGC GGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCATCCGTGT CTATCTGTACCCTGTTGCTTCCGGCGTGGCCACGGCCCGCCGAGACTAACATT TGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTAGTTAAACAATCGTTAAACT TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA TAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTG CGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA AGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGCAACGGGGACGGGCCAAAA GGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGC TCCCGTAGGTCCAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCAATCTTTTTAACCAGGTTG ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG GA

Fortsetzung Tabelle 52: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Eurotium amstelodami* (DSM 62629) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
Fun18sf/ITS4	TTGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATT ACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCG GTGAGGCCTTCGGACTGGCTCCAGGGGGTTGGCAACGACCCCCAGAGCCGG AAAGTTGGTCAAACCCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGTTTTCC GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGCCCTCTGGGTCCAAC CTCCCATCCGTGTCTATCTGTACCCTGTTGCTTCGGCGTGGCCACGGCCCGCC GGAGACTAACATTTGAACGCTGTCTGAAGTTTGCAGTCTGAGTTTTTAGTTAAAC AATCGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTT TGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC ATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTTCCGTCCCTGGCAACGGG GACGGGCCAAAAGGCAGTGGCGGCACCATGTCTGGTCCCTCGAGCGTATGGG GCTTTGTACCCCGCTCCCGTAGGTCCAGCTGGCAGCTAGCCTCGCAACCAATC TTTTAACCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCAT ATCAATAAGCGGAGGA

Tabelle 53: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Penicillium chrysogenum* (DSM 844) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
0817/1536	TTAGCATGGAATAATrGAATAGGACGTGTGGTTCTATTTTTGTTGGTTTCTAGGAC CGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGGCGTCAGTATTCAGCTGTCAGAG GTGAAATTCTTGGATTTGCTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGA TGTTTTTCATTAATCAGGGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCG TCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATCGGACGGGATTCTATAAT GACCCGTTCCGGCACCTTACGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCTGGGGGGAGTAT GGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACAAGGCGTGG AGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCCAGACAAAA TAAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGCATGG CCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTGCGATAACGAACGAGAC CTCGGCCCTTAAATAGCCCGGTCCGCATTTGCGGGCCGCTGGCTTCTTAGGGG GACTATCGGCTCAAGCCGATGGAAGTGCGCGGCAATAACAGGTCTGTGATGCC CTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCGCTACACTGACAGGGCCAGCGAGTACAT CACCTTAACCGAGAGGTTTGGGTAATCTTGTTAAACCCTGTCGTGCTGGGGATA GAGCATTGCAAT
NS7/NS8	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCT ACACTGACAGGGCCAGCGAGTACATCACCTTAACCGAGAGGTTTGGGTAATCTT GTTAAACCCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG GAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATTACGTCCCTGCCCTTT GTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGCCTTGGGA TTGGCTTAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCAGAGCCGAAAACCTTGGTCAAAC CGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCG GA
U1/U2	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCGACCAGACTCGCTCGCGGGGTTTCAG CCGGCATTCTGTCGGGTGTAATTTCCCGCGGGCGGGCCAGCGTTCGGTTTGGG CGGTCGGTCAAAGGCCCTCGGAAGGTAACGCCCTAGGGGCGTCTTATAGCCG AGGGTGCAATGCGACCTGCCTAGACCGAGGAACGCGCTTCGGCTCGGACGCT GGCATAATGGTCGTAACGACCCGTCTTGAACACGGACCAAGGAGTC

Fortsetzung Tabelle 53: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Penicillium chrysogenum* (DSM 844) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCC AACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTAACT GGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCCCGCCGAAGACACCCTC GAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAATAATAAATTATTTAAAACCTTCA ACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAC GTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC CCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCA CGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGG CAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCT CTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACC TCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
ITS1F/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTG CGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGT TATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCT TACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGAT TGTAAGTCTGAGTGAATAATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT TCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAAT TCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG GCGCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGTTGGGC CCCGTCCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCCGG TCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGC GCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
Fun18sf/ITS4	TTGCTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATT ACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCCGCCGTGCTACTACCGATTGAATGGCTCA GTGAGGCCTTGGGATTGGCTTAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCAGAGCCGA AACTTGGTCAAACCTCGGTCAATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCC GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAAC CTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGC CGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAA CTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAATAATAAATTATTTAAAACCTTTCAACA ACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA TGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCC TGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGG CTTGTGTGTTGGGCCCGTCCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAG CGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCTGT AGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCG GATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Tabelle 54: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Wallemia sebi* (DSM 5329) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
0817/1536	TTAGCATGGAATAATrrAATAGGACGAGTGATTCTATTTTGTGGTTTATAGAACC ACCGTAATGATTAATAGGAACAGTTGGGGCATTAGTATTCAGTTGCTAGAGGT GAAATTCCTGGATTTACTGAAGACTAACTACTGCGAAAGCATTGGCCAAGGATGT TTTCATTAATAAAGGACGATGGTTGGGGGATCGAAAATGATTAGATACCGTTGTA GTCCCAACAGTAACTATGCCGACTGAGGATTGGATGACGTTATATTATTGACTC ATTCAGCACTCTGCGAGAAATCAAAGTTTTTGGGCTTAGGGGGGAGTATGGTCG CAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGAGCACCACAAAGAGTGGAGCCT GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTCACCAGGTCCAGACATAGTAAGG ATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTT CTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACCTTAAC CTGCTAAATAGCCGGTACGACATTTTGTGTACATTGGCTTCTTAGAGGGACTAT TGATGTTTAAATCAATGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGAT GTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGACAGAGGCAGCGAGTATTATATTCCT TATTCGAAAGAATTGGGTAATCTTGTTAACTCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCAT TGCAAT
NS7/NS8	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCT ACACTGACAGAGGCAGCGAGTATTATATTCCTTATTCGAAAGAATTGGGTAATCT TGTTAAACTCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGA GGAATTCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTATTACGTCCTGCTCTTT GTACACACCGCCCGTCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAATCCTTCGGAG TGGTCTAATTGAGCCGGCAACGGCACATTTGGACTGCAAAGTTGGGTAACCTTG GTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGA
U1/U2	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGTTTGAAGTTAGTCTGATAGAAGTTGTTCAATT GTTACTTTGGTTTCAATGTATGCAACTTTTTATCGGTCAACATCAATTTTGATTGA TGGATAAAGGTAATAGAAATGTGGCTACATTTGTAGTGTATAGTCTATTATCATA AACATTGATTGAGATTGAGGACGGCAGTGTACCTTTTAGGAAGGTGTTGCGACC TATTACACTAAGGATGTTGACAAAATAGCTTTAAGCGACCCGTCTTGAAACACGG ACCAAGGAGTC
ITS1/ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGTA AAAAC TCATAATCTTCTACAAACCACTGTTTTAAAATGTTTACTAGAATGTCCAAGCAGTT AAGCTGTTGAAATATTAAGTTTAATAAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTC AGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATAC AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCACTCTATGGTATTCCGTAGAGTA CGTCTGTTTGAGCGTCGCGAACATCTCCATAATTAGTTTTTTtAAATTGATTAAG GGTTTTGAGGTTGTCATTGTATTATGACTCCCTTTAAAATGATTAGTGATGACCTT ATGAATGGGTTAATACTGTGTGTTATAATGGATTACATCCATCACCAGTCAGAGA GTAATCTCGCCTTAGTAATTTGTAGTGATTGCTTCTAATAGCCTTTaTTGGCAAm ATAAATGATCAAATCGACCTCAAATCAGATGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCAT ATCAATAAGCGGAGGA
ITS1F/ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTG CGGAAGGATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGTA AAAACTCATAATCTTCTACAAA CCACTGTTTTAAAATGTTTACTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGTTGAAATATTA AAAGTTTAATAAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTCAGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACAGTGAATCATCGAATC TTTGAACGCAAATGGCACTCTATGGTATTCCGTAGAGTACGTCTGTTTGAGCGT CGCGAACATCTCCATAATTAGTTTTTTtAAATTGATTAAGGTTTTGAGGTTGTC ATTGTATTATGACTCCCTTTAAAATGATTAGTGATGACCTTATGAATGGGTTAATA CTGTGTGTTATAATGGATTACATCCATCACCAGTCAGAGAGTAATCTCGCCTTAG TAATTTGTAGTGATTGCTTCTAATAGCCTTTaTTGGCAAmATAAATGATCAAATCG ACCTCAAATCAGATGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG A

Fortsetzung Tabelle 54: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von DSMZ-Referenzstamm *Wallemia sebi* (DSM 5329) nach Amplifikation mit sechs unterschiedlichen Primerpaaren

Primerpaar	Sequenz (5' → 3')
Fun18sf/ITS4	TTGTTCTTCAACGAGGAATTCTTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTA CGTCCCTGCTCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAG TGAATCCTTCGGAGTGGTCTAATTGAGCCGGCAACGGCACATTTGGACTGCAA GTTGGGTAAACTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGTA AAAACTCATAA TCTTCTACAAACCACTGTTTTAAATGTTTACTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCT GTTGAAATATTA AAAAGTTTAATAAACTTT CAGCAACGGATCTCTTGGTTCAGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACAGTG AATCATCGAATCTTTGAACGCAAATGGCACTCTATGGTATTCCGTAGAGTACGTC TGTTTGAGCGTCGCGAACATCTCCATAATTAGTTTTTTTTtAAATTGATTAAGGGTT TTGAGGTTGTCATTGTATTATGACTCCCTTAAAATGATTAGTGATGACCTTATGA ATGGGTTAATACTGTGTGTTATAATGGATTACATCCATCACCAGTCAGAGAGTAA TCTCGCCTTAGTAATTTGTAGTGATTGCTTCTAATAGCCTTTaTTGGCAAmATAAA TGATCAAATCGACCTCAAATCAGATGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA TAAGCGGAGGA

10.1.2.2 Untersuchungen der Pilzdiversität bei Stall- und Hausstaubproben

Tabelle 55: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel

Probenquelle	Sequenz (5' → 3')
Hühnerstall	<p><u>Bande A (556 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTTTTTAACTCTCCAAACCA TGTGAACTTACCACTGTTGCCTCGGTGGATGGTGTCTGTCTCTCGGGACGGTrCC ACCGCCGGTGGACTACCTAAACTCTGTAAATTTTTGTCAATCTGAATCAAACCTAA GAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT CTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGC TCATTTCAACCCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAGACTGCCTAATACGCAGCT CCTCAAACCAGTGGCGGAGTCGGTTCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTATC TCGCTTCTGCAAGCCGGACTGGCAACAGCCATAAACCGCACCCCTTCGGGGGCA CTTTTTAATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT CAATAAGCGGAGGA</p> <p><u>Bande B (546 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATCAAATCCATTCACTCACT CAGAGAGGATGGTACCTGTATGATGTGCTATCyCACGCTGTTGGGAGAGCCATT GCAATGTAATGACATGTATTCTAAATTTGTATCGCGTACTCACTTTACTAAGTTAG TCGCGTGTGCGCCAGCCATCGGCTGTTTTGACAACAATTTTACCAATTTGTGCTA TTGAGATTA AAAACA AAAACAAGACTCAATGTGGGGGATCACTTAGTCCTTAAATCG ATGAAAAACATAGTAATTTGTGGAAAATGATGTGAGTTGTGAAATTTTGTGAGCA TTGTGTTTTTGAATGAAAATTTT CAGCATGGATGCATGCGTGTCTATGCTGCATTT GTTTCAGTATATATCAATGTAAATTTGTCGTTACTATTGCTTGAAAGCAATAGTAT AAACTGTTGCGGATCACAAGTGTGATATCGATCTTGCGTTATATGACGTGTATCT GAAATCAAGTGTGACGACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p> <p><u>Bande C (521 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATAGTGCCCATTGATGCAAATCAT TGGGTTAGATCTGCCCTTATCGCAAGATGAGGGCTTCCATATACACCGTGAAC GTGGCTTCGGCCATCACAACCTGTTAGTAATGAATGTAATATCATAACAAAAACA AAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA TGCATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCA CCTTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAAACCT CACCCACTTAGGTTTTTGCCTAAGCGGTGGTGTATTGGGTGTTTGCCTTGCTA AAGGCTCGCCTTAAAGATATAAGCACCTTGGATGTAATACGTTTCATCCTTCTGG GTGGCTGATAACCCACATATTCATGATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGGCTACC CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p>
Schweine stall	<p><u>Bande D (475 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATAACACCTTCACTGTG TGGGCGTACGAAACACTGCAAACATGTAATACGGAAGTCAAGGAACTGTTAAGA ATAAACTTTCAACAACGGATCCGTTAGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCG AAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAAC GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCTTTTC CATCTCACGCTGCTGCCGTGCGGACCCAGCCArCGATGGACGTGGGTGyGCGT GGGGGCGGGGTGGAGCTGGCAGCGCCTAGGCCTTGCCGAAAAGAAACGAGGA GAAGCGAACTATATTGGTGC GCGGACCCGGCTTTACATCGAGCTCGACCTCAA ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p>

Fortsetzung Tabelle 55: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel

Probenquelle	Sequenz (5' → 3')
Schweine Stall	<p><u>Bande E (402 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATAAAAACTAATTTACACGCGATTAAA ATTGCTTACTTCAATAACCTATTAACAATCAACCACTAATACCAAAACTTCCA ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACG TAATATGAATTGCAGATTTTGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC GTGGGTATTCGCGGGCATGCGTGTGTGAGCGGTTATCTCCCTCGCAGGTAA TGGCATACGGCGTCAGCTGTTCCCTCCAAAAGTGATTGGTGTAGTATTACAGT TTAICTACAACCATACTTTTTCCCTCACACCGTAAGACTACCCGCTGAACTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA</p>
Matratze	<p><u>Bande F (568 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATATGAAAGCGGGGCTGGAA TCCTTTGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCGTGTCTTTTGCCTACTTCT TGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCATAGGACAAACCATTAACTTTTGTAAAT GCAATCAGCGTCAGTAAAAAATTAATAATTACAACCTTTTAAACAACGGATCTCT GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAA AGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGG CGTCTTGTCTCCAGTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCT ACTGTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCGCTCTTCCAGCGAAGGTCAGCAT CCACAAAGCCTTTTTTCACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p> <p><u>Bande G (545 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTGAAGGGCCTCCGGGCC CGACCTCAACCCTTTGTATTCCGACTCTGTTGCCTCGGGGGCGACCCGGCCT TCGGGCGCGGGGCCCGGGCGGTCCACTCAACTCTGCATCTTTGCGTCTGAGT AAAYATTTGAATCAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGCATTCCGAAGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGCCGCGGTCCGC CGCGCGCCTCAATGTCTCCGGCTGAGCCGTCCTCTAAGCGTTGTGAATCA ATCAATCCGCTTTCGAGGCCGGGCTGGCTGCGCGCCGTTAAACCCCCATTCT TCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAGCGGAGGA</p>
Kuhstall	<p><u>Bande H (557 nt):</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTCCGGCCG GGGATGTTTATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCCTGC CTTTTACGGGCGGGGGCCCGGGTGGACACATCAAACTCTTGCCTAACTTT GCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGG GGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCG ACGCGGTCCGCCGCGCGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTCAG CGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGCCACGGGAGGCCACGCCGAAAAACA AACCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG CATATCAATAAGCGGAGGA</p>

Fortsetzung Tabelle 55: Erhaltene Sequenzinformationen der Sanger-Sequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel

Probenquelle Sequenz (5' → 3')

Kuhstall

Bande I (556 nt):

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTCCGGCCG
GGGATGTTTATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGC
CTTTTACGGGCGGGGGCCCCGGGTGGACACATCAAACCTTTGCGTAACTTT
GCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAAATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCA
ACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAG
CGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGTGGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAACAAC
CCCATTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGA

Bande J (550 nt):

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTTTACCACCG
GGATGTTTATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCC
TTCGGGCGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTC
TGAGTAAATTTAATTAATAAATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT
GCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCG
GTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTG
TGGAACTATTCGCTAAAGGTGGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAACAACCCCAT
TTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGA

Tabelle 56: Erhaltene Sequenzinformationen der Parallelsequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel – Darstellung der drei häufigsten OTU-Sequenzen je Probenquelle

Probenquelle	Sequenz (5' → 3')
Hühnerstall	<i>Dermanyssus gallinae</i> (OTU 143; 462 nt) AAGGATCATTATTGAATCAAAATCCATTCACTCACTCAGAGAGGATGGTACCTGT ATGATGTGCTATCCCACGCTGTTGGGAGAGCCATTGCAATGTAATGACATGTAT TCTAAATTTGTATCGCGTACTCACTTTACTAAGTTAGTCGCGTGTCCGACCCAT CGGCTGGTTTGACAACAATTTTACCAATTTGTGCTATTGAGATTAACAAAACA AGACTCAATGTGGGGGATCACTTAGTCCTTAAATCGATGAAAAACATAGTAATTT GTGGAAAATGATGTGAGTTGTGAAATTTTGTGAGCATTGTGTTTTTGAATGAAAA TTTCAGCATGGATGCATGCGTGTCTATGCTGCATTTGTTTCAGTATATATCAATG TAAATTTGTCGTTACTATTGCTTGAAAGCAATAGTATAAACTGTTTCGCGATCACA AGTGTGATATCGATCTTGCGTTT
	<i>Microdochium nivale</i> (OTU 234; 507 nt) AGGGATCATTACTGAGTTTTTAACTCTCCAAACCATGTGAACTTACCACTGTTGC CTCGGTGGATGGTGTCTCTCTCGGGACGGTACCACCGCCGGTGGACTACCTA AACTCTGTTAATTTTTGTCAATCTGAATCAAATAAGAAATAAGTTAAACTTTCA ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC CATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCTA GCTTAGTGTGGGAGACTGCCTAATACGCAGCTCCTCAAACCCAGTGGCGGAG TCGGTTCGTGCTCTGAGCGTAGTAATTTTTTATCTCGCTTCTGCAAGCCGGACT GGCAACAGCCATAAACCAGCACCTTCGGGGGCACTTTTTAATGGTTGACCTCG GATCAGGTAGGAATACCCG
	<i>Epicoccum nigrum</i> (OTU 40; 495 nt) AAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGTCT TTTGAGTACCTTCGTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAACATTCAA ACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAAC AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCT GCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAAT TGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTCGACTCA CAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCG
Schweinestall	<i>Candida cabralensis</i> (OTU 245; 466 nt) AAGGATCATTACTGTGATAACACCTTACACTGTGTGGGCGTACGAAACACTGC AAACATGTAATACGGAAGTCAAGGAACTGTTAAGAATAAACTTTCAACAACGGA TCCGTTAGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGA ATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTA TTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAAGCGTCTGTTTCCATCTCACGCTGCTGCCGTG CGGACCCAGCCAACGATGGACGTGGGTGCGCGTGGGGGCGGGGTGGAGCTG GCAGCGCCTAGGCCTTGCCGAAAAGAAACGAGGAGAAGCGAACTATATTGGTG CGCGGACCCGGCTTACATCGAGCTCGACCTCAATCAGGTAGGAATACCCGC TGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGACTCGCGATAT
	<i>Candida catenulata</i> (OTU 210; 388 nt) AAGGATCATAAACTAATTTACACGCGATTTAAATTGCTTACTTCAATAACCTATT AAACAATCAACCACTAATACCAAACTTCCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATTTTGTG AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTGGGTATTCCCGCGGGCATGC GTGTGTGAGCGGTTATCTCCCTCGCAGGTAATGGACATACGGCGTCAGCTGTT CCTCCAAAAGTGATTGGTGTAGTATTACAGTTTACTCACAACCATACTTTTCCC TCACACAGTAAGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGACTC CGGATAT

Fortsetzung Tabelle 56: Erhaltene Sequenzinformationen der Parallelsequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel – Darstellung der drei häufigsten OTU-Sequenzen je Probenquelle

Probenquelle	Sequenz (5' → 3')
Schweineestall	<p><i>Dermanyssus gallinae</i> (OTU 143; 462 nt)</p> <p>AAGGATCATTATTGAATCAAAATCCATTCACTCACTCAGAGAGGATGGTACCTGT ATGATGTGCTATCCCACGCTGTTGGGAGAGCCATTGCAATGTAATGACATGTAT TCTAAATTTGTATCGCGTACTCACTTTACTAAGTTAGTCGCGTGTCCGAGCCAT CGGCTGGTTTGACAACAATTTTACCAATTTGTGCTATTGAGATTAACAAAACA AGACTCAATGTGGGGGATCACTTAGTCCTTAAATCGATGAAAAACATAGTAATTT GTGAAAATGATGTGAGTTGTGAAATTTTGTGAGCATTGTGTTTTGAATGAAAA TTTCAGCATGGATGCATGCGTGTCTATGCTGCATTTGTTTCAGTATATATCAATG TAAATTTGTCGTTACTATTGCTTGAAGCAATAGTATAAACTGTTTCGCGATCACA AGTGTGATATCGATCTTGCCTT</p>
Matratze 1	<p><i>Candida</i> sp. (OTU 46; 338 nt)</p> <p>AAGGATCATTATGAATATATACATTATTGTGGAATTACTTATATCTAATAATCTAT TTTTAATTACAACATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG CAGCGAACC GCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACG CACATTGCGCGGTGTGGCATTCCGCACCGCACGGATGGACGAGCGTGTCCCT CTGGGATCGCATCGCTTTTCTGAAATGAATGAATTACTTCAATACACTCTTTTCA CCTCGTTCATCCGAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAT ACGTCGTAT</p> <p><i>Candida deformans</i> (OTU 130; 347 nt)</p> <p>AAGGATCATTATTGATTTGACTATACTTTTGTGGATATTTAATTACATTAACCTCAT CATATCATTTTTAATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATG AAGAACGCAGCGAACC GCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATC TTTGAACGCACATTGCGCGGTGTGGTATTCCGCACCGCACGGATGGAAGAGCG TGTTCCCTTTGGGATCGCATTGCTTTTCTGAAATGAATCTATTACTTCAATATACA TCATTTACCTCTTTTATCCGAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC GGAGGATACGTCGTAT</p> <p><i>Epicoccum nigrum</i> (OTU 40; 495 nt)</p> <p>AAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGTCT TTTGAGTACCTTCGTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAACATTCAA ACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAAC AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCT GCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAAT TGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCA CAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCG</p>
Matratze 2	<p><i>Candida</i> sp. (OTU 46; 338 nt)</p> <p>AAGGATCATTATGAATATATACATTATTGTGGAATTACTTATATCTAATAATCTAT TTTTAATTACAACATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG CAGCGAACC GCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACG CACATTGCGCGGTGTGGCATTCCGCACCGCACGGATGGACGAGCGTGTCCCT CTGGGATCGCATCGCTTTTCTGAAATGAATGAATTACTTCAATACACTCTTTTCA CCTCGTTCATCCGAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAT ACGTCGTAT</p>

Fortsetzung Tabelle 56: Erhaltene Sequenzinformationen der Parallelsequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel – Darstellung der drei häufigsten OTU-Sequenzen je Probenquelle

Probenquelle	Sequenz (5' → 3')
Matratze 2	<p><i>Epicoccum nigrum</i> (OTU 40; 495 nt) AAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGTCT TTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAACATTCAA ACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAAC AACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCT GCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAAT TGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCA CAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCG</p> <p><i>Cryptococcus heimaeyensis</i> (OTU 119; 492 nt) AAGGATCATTAAATGATGCCCTCGAAGTCTTTGGACTGGTAGGGTTTGTGTCCGT CTCTTCGGAGTCGACCTTATCTCACACACCGTGAAGTGTGGCTTCGGCCATTTA CACAAACTGTTAGTAATGAATGAATATATCATAACAAACATAAAAACCTTTAAACAACG GATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGGACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTTCGCGCCCTTGG GTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTGTAGTGTATGAAACCTCACCCCACTTGGGT TTTTGCCCGAGCGGTGGTGGATTGGGCGTCTGCCGTTAATGGCTCGCCTGAAA AGCATAAGCAACTTTGGATGTAATACGTTTCATCCTTTGAGTGGCTGACAACCC AACATATCTCATGATCTGGCCTCAAATCAGGTAGGGCTACCCGCTGAACTTAAG CATA</p>
Matratze 3	<p><i>Candida</i> sp. (OTU 46; 338 nt) AAGGATCATTATGAATATATACATTATTGTGGAATTAATTATATCTAACTAATCTAT TTTTAATTACAACATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG CAGCGAACC GCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACG CACATTGCGCGGTGTGGCATTCCGCACCGCACGGATGGACGAGCGTGTCCCT CTGGGATCGCATCGCTTTTTCTGAAATGAATGAATTAATTCAATACACTCTTTTCA CCTCGTTCCGAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAT ACGTCGTAT</p> <p><i>Epicoccum nigrum</i> (OTU 40; 495 nt) AAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGTCT TTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAACATTCAA ACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAAC AACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCT GCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAAT TGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCA CAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCG</p> <p><i>Candida</i> sp. (OTU 87; 338 nt) AGGGATCATTATGAATATATACATTATTGTGGAATTAATTATATCTAACTAGTCTA TTTTAATTACAACATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAACC GCGATATTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAAC GCACATTGCGCGGTGTGGCATTCCGCACCGCACGGATGGACGAGCGTGTCCCT TCTGGGATTGCATCGCTTTTTCTGAAATGAATGAATTAATTCAATACACTCTTTTCA CCTCGTTCCGAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAG TACTAGACG</p>

Fortsetzung Tabelle 56: Erhaltene Sequenzinformationen der Parallelsequenzierung von Staubproben unterschiedlicher Herkunft nach PCR-SSCP-Analyse und Aufreinigung der Banden aus dem Polyacrylamidgel – Darstellung der drei häufigsten OTU-Sequenzen je Probenquelle

Probenquelle Sequenz (5' → 3')

Kuhstall	<p><i>Cladosporium cladosporioides</i> (OTU 193; 535 nt)</p> <p>AGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTTTACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGT TGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGGCGGGGGCTCCGG GTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAATTAATAA ATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTT CACCCTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAA ATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAG GTGGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGG ATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGACTAC</p> <p><i>Cladosporium sphaerospermum</i> (OTU 230; 533 nt)</p> <p>AGGGATCATTACAAGTGACCCCGGCTCCGGCCGGGGATGTTTCATAACCCTTT GTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTTTCACGGCGGGGGC CCCGGTGGACACATCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAAATTTAAT TAATAAATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC TTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCG TCATTTCAACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGACGCGGTCCGCCGCGCG CCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTCAGCGTTGTGGAAACTATTCG CTAAAGGTGCCACGGGAGGCCACGCCGAAAAACAACCCCATTTCTAAGGTTG ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGC</p> <p><i>Epicoccum nigrum</i> (OTU 40; 495 nt)</p> <p>AAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCATGTCT TTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCGATTGGACAACATTCAA ACCCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAAC AACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCT GCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAACAAT TGGCAGCCGGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCA CAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGG GATACCCG</p>
----------	--

10.1.2.3 PCR-SSCP-Analyse von Matratzenstaubproben (GABRIEL) zur Bestimmungen von Assoziationen zwischen Schimmelpilzexposition und Asthmarisiko bei Schulkindern

Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	1	<i>Exophiala</i> sp. (612 nt) TCCGTAGGyGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCC GCAGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTCTAATTTACCTTGTCGTTGCTTCG GCGGACCGGTTGACCAACTGGTCTTGACCGCCGGGGGTTTCGTCCCC TGGAGAGCGTCCGCCGACGGCCCAACCACAACTCTTGTACCAAACCA TGTCGTCTGAATTACTTGATTAATAATCAAAAAACAAAACCTTCAACAACG GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT AATGCGAATTGCAGAATTTCCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCACTGGTATTCCGGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCC TCCCTCAAACCCCGTGTTTGGTGTGGGCCCGCGTTTCTGCGAAGGAA CTGGCCTCAAAGACAATGACGGCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACG AGCTTTCAGGAGCACGCGCCGAGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCT AACCCTTTTTTACTTATAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
	2	<i>Exophiala</i> sp. (612 nt) TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCC GCAGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTCTAATTTACCTTGTCGTTGCTTCG GCGGACCGGTTGACCAACTGGTCTTGACCGCCGGGGGTTTCGTCCCC TGGAGAGCGTCCGCCGACGGCCCAACCACAACTCTTGTACCAAACCA TGTCGTCTGAATTACTTGATTAATAATCAAAAAACAAAACCTTCAACAACG GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT AATGCGAATTGCAGAATTTCCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCACTGGTATTCCGGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCC TCCCTCAAACCCCGTGTTTGGTGTGGGCCCGCGTTTCTGCGAAGGAA CTGGCCTCAAAGACAATGACGGCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACG AGCTTTCAGGAGCACGCGCCGAGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCT AACCCTTTTTTACTTATAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
	3	<i>Exophiala</i> sp. (612 nt) TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCC GCAGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTCTAATTTACCTTGTCGTTGCTTCG GCGGACCGGTTGACCAACTGGTCTTGACCGCCGGGGGTTTCGTCCCC TGGAGAGCGTCCGCCGACGGCCCAACCACAACTCTTGTACCAAACCA TGTCGTCTGAATTACTTGATTAATAATCAAAAAACAAAACCTTCAACAACG GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT AATGCGAATTGCAGAATTTCCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCACTGGTATTCCGGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCC TCCCTCAAACCCCGTGTTTGGTGTGGGCCCGCGTTTCTGCGAAGGAA CTGGCCTCAAAGACAATGACGGCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACG AGCTTTCAGGAGCACGCGCCGAGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCT AACCCTTTTTTACTTATAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	5	<p><u><i>Exophiala</i> sp. (589 nt)</u> GGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCCGCAGCCGACCTCCCAACCCTTT GTCTAATTTACCTTGTCTGTTGCTTCGGCGGACCGGTTGACCAACTGGTC TTGACCGCCGGGGGGTTCGTCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACGGCCC AACCACAAACTCTTGTACCAAACCATGTCGTCTGAATTACTTGATTA TCAAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCGAATTTCCGTGA GTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGTGGGC ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGTGTTTGGTGT GGGCCCGCGTTTCTGCGAAGGAACTGGCCTCAAAGACAATGACGGCGT CCGCGGGACCTCGGTGCAACGAGCTTTCAGGAGCACGCGCCGAGTT TCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCTAACCTTTTTTTACTTATAAGGTTGA CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCG GAGG</p>
	6	<p><u><i>Exophiala</i> sp. (612 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCC GCAGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTCTAATTTACCTTGTCTGTTGCTTCG GCGGACCGGTTGACCAACTGGTCTTGACCGCCGGGGGGTTCGTCCCC TGGAGAGCGTCCGCCGACGGCCCAACCACAAACTCTTGTACCAAACCA TGTCGTCTGAATTACTTGATTAATAAATCAAAAAACAAAACCTTTCAACAACG GATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT AATGCGAATTGCGAATTTCCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATT GCGCCCACTGGTATTCCGGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCC TCCCTCAAACCCCGTGTTTGGTGTGGGCCCGCGTTTCTGCGAAGGAA CTGGCCTCAAAGACAATGACGGCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACG AGCTTTCAGGAGCACGCGCCGAGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCT AACCTTTTTTTACTTATAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG CTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p>
	7	<p><u><i>Glyphium elatum</i> (621 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTAGGGTGTCCCT CACCGGCGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTCTAAATTACCTTGTCTGTTG TTCGGCGGACCGGTTGACCAACTGGTCTTGACCGCCGGGGGGGCTTC CCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACGGCCCAACCACAAAACCTTGTAC CAAACCATGTCGTCTGAATGTACTTGATTAAGAATCAAAAAACAAAACCT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGCGAATTGCGAATTTCCGTGAGTCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGTGGGCATGCCTGTTTCGAGC GTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTGGACCCAAGTTGTG CATCTGAACAACCTGGTCTCAAAGACAATGACGGCGTCCGTGGGACCCT CGGTGCAACGAGCTTCTAGGAGCACGCGTTCGAGTTTCAAGGTCCCTCC GGGCCGGTCTCCTTCTTACTATTTACAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG GAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p>

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	8	<p><i>Glyphium elatum</i> (621 nt)</p> <p>TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTAGGGTGTCCCT CACCGGCGCCCGACCTCCCAACCCTTTGTCTAAATTACCTTGTCTGTTGC TTCGGCGGACCGGTTGACCAACTGGTCTTGACCGCCGGGGGGGCTTC CCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACGGCCCAACCACAAAACCTTTGTAC CAAACCATGTCTGTCTGAATGTACTTGATTAAGAATCAAAAAACAAAACCTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTTCCGTGAGTCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGTGGGCATGCCTGTTTCGAGC GTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGGGTTTGGTGTGGACCCAAGTTGTG CATCTGAACAACCTGGTCTCAAAGACAATGACGGCGTCCGTGGGACCCT CGGTGCAACGAGCTTCTAGGAGCACGCGTCGAGTTTCAAGGTCCTTCC GGGCCGGTCTCCTTCTACTATTTACAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG GAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p>
	9	<p><i>Penicillium commune</i> (568 nt)</p> <p>TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTG GGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCC CGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCC GCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAA TATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTG AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT TGGGCCCGTCTCCTCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGG CGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCT GTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTT GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAG CGGAGGA</p>
	10	<p><i>Penicillium lanosum/nalgiovense</i> (585 nt)</p> <p>TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTG GGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCC CGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCC GCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAA TATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTG AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT TGGGCCCGTCTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGG CGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCT GTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTT GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAG CGGAGGA</p>

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	11	<p><i>Penicillium lanosum/nalgiovense</i> (563 nt)</p> <p>GGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGT TTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCGGG GGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTC TGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAA CAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG ATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT GCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCTCCGATCCCC GGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGA GCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGC CGATCAACCCAAATTTTTATCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA CCCCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG</p>
	12	<p><i>Penicillium lanosum/nalgiovense</i> (585 nt)</p> <p>TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTG GGTCCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCC CGCCTTAAGTGGCCGCGGGGGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCC GCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAA TATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTG AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGG GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT TGGGCCCGCTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGG CGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCT GTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGTT GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG CGGAGGA</p>
	13	<p><i>Aureobasidium pullulans</i> (581 nt)</p> <p>TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAG CGCCCGACCTCCAACCCTTTGTTGTTAAAACCTTGTGCTTTGGCG GGACCGCTCGGTCTCGAGCCGsTGGGGATTCTCCrGGCGAGCGCCC GCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTTATTTAACCGGTCTGsTGAGTTAAAA TTTTGAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGG GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACCACTCAAGCTATGCTTGGTATT GGGCGyCGTCCTTAGTTGGGCGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGCCwC TCCGGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTATTTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAG GAACTCTGCCGACTGAAACCTTTATTTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAG GTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA</p>

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	14	<u><i>Phialophora europaea</i> (610 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTAGGGTGCCTAA ACCGCGCCCGACCTCCAACCCTTTGTCTACCTGACCTTATGTTGCTTCG GCAGGCCCGCCTTCCCCTCCGGGGAGGCCGCCGGGGTCCGCAAGG ACCCCGGGCCCGCCTGTGACGGCCCTCATACCTAAACTATTGTTA AAACGTGTCGTCTGAGTTATCTAAACAAATGAAAATTTAAACTTTCAACA ACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AGTAATGCGAATTGCAGAATCCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATC ACCCCTCAAGCCCGGCTTGTTGTTGGTTGTAGCGGCCCCCGCTCTT CCCAAAGATAATGACGGCGTCTGTGAGGACTCCTGTACACTGAGCTTTC GGGCACGTACTAGGCTAGAACTTCAGACCCGGTCACCGTCCCCTCTGG GGACTACTTTTACCAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCT GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
	15	<u>unkultivierter Pilz (596 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTAAGGGTCTTCTA GGCCCGACCTCCCACCCTTTGTGTCGAACAAATCTTGTTGCTTTGGCG GGACCGTCGGCCCTCACGGGTCCGGTCCCGGGTCCCGACCGGGTAA GCGCCCGCCAGAGACCAACTAACTCTTCGTTAAACACTTCGTCTGAG TAAAATGATTTAATCAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGTTATTC CGGGGGCATGCCTGTTCCGAGCGTCATTACACCAATCAAGCTCAGCTT GGCATTAGGTCTTTCGTCCGCGGTCAAACGCGGGCGGGCCTCAAACCT TTCGGCGGAGTCAATCCGGCTTCCGGCGTAGCAGAATCTGTCAAACG TCCGTGTGGCCGGTGGTCTTCAGCCGCCAAACCCATACATTTTTTAA AGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCGCTGAACTTAAGCATATCA ATAAGCGGAGGA
	16	<u>nicht editierbar</u>
1132	1	<u>unkultivierte <i>Pleosporales</i> sp. (571 nt)</u> TCCsTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTGGGGCTCCGGCCCC GTCGAGATAGAACCCTTGCCTTTTCGAGTACCGTCCGTTTCCTCGGCAG GCCCGCCTGCCAATGGGGACCCCAAACAAACCCTTTTTGTACCTGTACC AGTCTGAACAACAACAAAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTG CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGG TATTCCTTAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACAACCTCAAGCTCC GCTTGGTGTGGGTGTCTGTCCCGCCCCCGGGTGCGGACTCGCCT CAAATTCATTGGCGGCCGGTACATTGGCTTCGAGCGCAGCAGAAACGC GAACTCGAGGACGGTGGATCCGCTCCCAGAAGCCAACCCCATATTTTG ACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC GGAGGA

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
1132	2	<u>unkultivierter Pilz (558 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGACGTACGCCCTTC GGGGTATACCTCCCACCCTTTGTTTATATTACCTGTGTTGCTTTGGCTGA CCTGCCCTTGGGCTCCCGGCTTCGGCTGGGTCGTGTCAGCCAGAGGA ATATCAAACCTCTGATTGTATTTATTGTCTGAGTAATAACTTAATAGTTAAA ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT TGAACGCACATTGCGCTCCCTGGTATTCCGGGGAGCATGCCTGTTTCGA GCGTCATTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCTCTGCTGGAAA CGGCAGGCCTTAAAATCAGTGGCGGTGCCTCTCGGCTCCAAGCGTAGT AATTCTTCTCGCTTCGGATCACCGGGTGTGTGCTTGCCAACAACCCCA ATTTTTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAA GCATATCAATAAGCGGAGGA
	3	<u>unkultivierter Pilz (558 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAAGTACAGGCCCTT CGGGGGCTACACTTCCACCCTTTGTTTACCACACACGTTGCTTTGGCGG GCCGCCTAGCTACTGGCTTCGGCTGGTAAGTGCCCGCCGGAGAACCC CAAACCCAAACCATTTTACCGTGTCTGAATACAAGTTAAATATTTA AAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAG CGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT CTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTATCACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGGCTGCC GTCACAGGCAGCCCCTAAAAGCAGTGGCGGTGCCGTCAGGCTCTAAGC GTAGTAATACTCCTCGCTATAGGGTCTGGTGGTGTCTGCCAAAACCC CCCAATTTTTCATGATTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
	4	<u>unkultivierte Ascomycota sp. (571 nt)</u> GGATCATTACATTAGTAGCTTGCTACTGTTAGGGGGGTCTGTCAGTCT GTATAGTATCACTACTGATGAGCAGCACGACCCTCTGTCTGTACCCTTG TCTTTTGCGCACTCATGTTTCCTCGGCGGGTCTACACCCGCGGGCTGG ACAACTCATAACCTTTTTAATTTTCAATCAGCGTCTGAAAAACCTAATAAT TACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC AGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGT TCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTG CACTCCCAGTGTTTGGACTCGCCTCAAAGCAATTGGCAGCCAGTGTTT TGGTATTGAAGCGCAGCACATTTTGCATTCTAGCCTAGAATACTAGCG TCCAGTAAGCCTTTTTTCCACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACC CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
1410	1	<u><i>Saccharicola bicolor</i> (555 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATTACGAAAGCTATAGCCC CTTCGGGGGTTATTGCATCCACCCTTTGTCTACGTGTACCTCTTGTTGTT TCCTCGGCAGGCTTGCCTGCCGCCAGGAATCCCTTAAACTCTTGATTT ACAGTATTAATAATCTCTGATAACTATTTAAATTATTACAACCTTTCAACAAT GGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAA GTAGTGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGCGCCCCTCGGTATTCCGTGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTA CACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCTGTGCCGCTTCATGCGT GGACTCGCCCCAAGTCATTGGCAGCGGTGCGCCAGCTTCTCGCGCA GCACATTTGCGTTTCTTGAAGTTTGGTGGATCAGCATCCAGTAAGCTCT TTTATGACTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA TATCAATAAGCGGAGGA
	2	<u><i>Ascomycota</i> sp. (570 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTTTTCAGTACTTTGGGGGC TGTCAGTCTATATCACTATAGCAAGCCTCCGTCTGAAACCCTTGCTTTT GCGTACCTTATGTTTTCTCGGCGGGCTTGCCCGCCGGTTGGACAACCT TTAAACCTTTTTAATTTTCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAATTACAA CTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT GAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAG CGTCATTTGTACCCTCAAGCTATGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCTC CTTTTGCATTGGACTCGCCTCAAAGACATTGGCAGCCAGTGTATTGGT CTTGAAGCGCAGCACATTTTGCATTCTTGCTGATAATCACTAGCATCC AGTAAGCCTCTTTATCACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGC TGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
	3	<u><i>Pseudotaeniolina globosa</i> (545 nt)</u> TCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTGAAGGGCCTCCG GGCCCGACCTCCAACCCTTTGTATTCCGACTCTGTTGCCTCGGGGGCG ACCCGGCCTTCGGGCGCGGGGCCCCCGGCGGTCCACTCAACTCTGCA TCTTTGCGTCTGAGTAAATATTTGAATCAATCAAACTTTCAACAACGGA TCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC GCCCTTTGGCATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACACCA CTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCGCCGCGGTCCGCCGCGCGCCTCA ATGTCTCCGGCTGAGCCGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGAATCAATCAATC CGCTTGCAGGGCCGGGCTGGCTGCGCGCCGTTAAACCCCCATTCTTC TAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC AATAAGCGGAGGA
	4	<u><i>Didymella exitialis</i> (520 nt)</u> GGATCATTACCGAGAGTTGCAGGCTTTTGTCTGCCATCTCTTACCCATG TCTTTTGCCTACTACAGTTTCTCGGCAGGTCCGCCTGCCGTTAGGAC CACATTAACCATTTGCAGTTGCAGTCAGCGTCTGAAAACTTAATAATT ACAACCTTTAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCC CGCCTTTGTGCGCGGACTCGCCTTAAAGCAATTGGCAGCCGGCGTATT AGTTTTCGGAGCGCAGCACAAATCGCGCTCTGTGCTTATACGGGTAGCAT CCATCAAGACTATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
1410	5	<u>unkultivierte <i>Ascomycota</i> sp. (549 nt)</u> GGATCATTACCCTTTGCTTATGGCACTCCTTAGGCCTAGCCTTAGGTTT GCCCTGGCAATAAACCTTGACCTGGTCTACCATATGTCTGTCCCTTGG CAGGCTTGTGCCTGCCATGGGCGTTACACAAACCTTTGAATAGCAGCCT ACAATCCTTCTGAGCAATGCTAAATTATCACAACTTTCAACAATGGATCT CTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTG TGAATTGCAGACTTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCC TTTTGGAATTCCAATTGGCATGCCTGTTTGAAGCGTCATATACTCCCTCAA GCGTTGGCTTGGTGTGGGCAACTGTCCTATGCACAGCAAGGACTTGC CTCAAAGTATTGGCTGTTGGCCTACCAGCTCCTTGCAGCAAGCACTTGCCT GTTTTGAGGCTAGGTAATAGGCTGATGTTCCAGCAAGAACTCCCCTTG TTTGACCTCAAATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT AAGCGGAGG
34,7 %	1	<u><i>Rumex acetosa</i> (588 nt)</u> AAGGATCATTGTGCGAAACCTGCGCGAGCAGACAGACCCGCGAACACGT TCTTAAAAAACGAACCCAACCCCGGCGCGGATTGCGCCAAGGACCAC GAACAAAGGCGCCCCCGCGCGGCCCGGTCTCCGGAGCCCGCTCGG CGGCGGCGTGTCTTTACTATTAACAAAAACGACTCTCGGCAACGGATA TCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTG TGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGC CCGAAGCCTTCTGGCCGAGGGCACGTCTGTCTGGGCGTCACGCACCG CGTCGCCCACTCCCAGCGGGAGGGGCGGAGATTGGCCCCCGTGC CTCCGCGCGCGGTCCGCCTAAAAGCAGACCCCGCGGCCGAATAGAAT CGGCGCGACGATTGGTGGCGTAAACATGGCATCGCGTCCGCGCCCTCT GCGGCCAACGAAAGTCTAGGAAACACTCACGCGGACCCTCGGGTCC GCCGTTGCGACCCAGATCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTAAGCAT ATCAATAAGCGGAGG
	2	<u>unkultivierter Pilz (571 nt)</u> AAGGATSATTAAWGAGTAAGGGTYGCTGGCCCGAMCCTCCTACCCTCT GTTGTTATAACTACTTTGTTGCTTTGGCGGGACCGCSMASGTTCTCCCG AGCGCGCCGGTCKSCGGACAGGCGAGCGCCCGCAGAGTCTAACCAA WCTCTTGTTTTAAACCAGTCRTCTGAGTATAAAAATTTAATTAATTA CTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGMATCRATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT GAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAG CGTCATTACACCACTCAAGCACCGCTTGGTATTGGGCATCGTCCGTCGA AAGGCGGGCGTGCCTCGAAGACCTCGGCGGGGTTTCTCCAACCTTCGG GCGTAGTARAGTTAAATCAAACGTCCTATAAGCTTGGTGAGATCTCATT GCCGTTAAACCTTTTAATTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
	3	<u>nicht editierbar</u>

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
42,9 %	1	<u><i>Septoria dysentericae/convulvulilycopersici</i> (517 nt)</u> AGGGATGATTAAGAGATAGGGTCTTCATGGCCCGACCTCCAACCCTCT GTTGTTAAAACCTTGGTCTTTGGCGGGACCGTCTCGGTCTCCGAG CGCACTAACCTCGGGTGGTGAGCGCCCGCCAGAGTCCAACCAAACCT CTTGATTAACAGTCGTCTGAGTATAAAATTTAAATTAATAAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTSGCATCGATGAAGAACRCAGCGAAAT GCGATAAKTAATGTSAAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCKGKCGAGCGT CATTACACCACTCAAGCATCGCTTGGTATTGGGAACGGTCCGTGCGAAG GCGGGCCTTCCTCSAAGACCTCGGCGGGGTTCAACCAACTTCGGGCGT AGTAGAGTTAAATCGAACGTCTTATAAGCTTGGTCGGATCTSATTGCCG TTAAACCTTTAAATTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
	2	<u>nicht editierbar</u>
	3	<u>nicht editierbar</u>
53,0 %	1	<u><i>Sydowia polyspora</i> (569 nt)</u> AAGGATGATTAAGAGATAGGGTCTTCATGGCCCGACCTCCAACCCTCT GTTGTTAAAACCTTGGTCTTTGGCGGGACCGTCTCGGTCTCCGAG CGCACTAACCTCGGGTGGTGAGCGCCCGCCAGAGTCCAACCAAACCT CTTGATTAACAGTCGTCTGAGTATAAAATTTAAATTAATAAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACRCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAGCGT CATTACACCACTCAAGCATCGCTTGGTATTGGGAACGGTCCGTGCGAAG GCGGGCCTTCCTCSAAGACCTCGGCGGGGTTCAACCAACTTCGGGCGT AGTAGAGTTAAATCGAACGTCTTATAAGCTTGGTCGGATCTSATTGCCG TTAAACCTTTAAATTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
	2	<u><i>Sydowia polyspora</i> (569 nt)</u> AAGGATGATTAAGAGATAGGGTCTTCATGGCCCGACCTCCAACCCTCT GTTGTTAAAACCTTGGTCTTTGGCGGGACCGTCTCGGTCTCCGAG CGCACTAACCTCGGGTGGTGAGCGCCCGCCAGAGTCCAACCAAACCT CTTGATTAACAGTCGTCTGAGTATAAAATTTAAATTAATAAACTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACRCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGTGAATGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAGCGT CATTACACCACTCAAGCATCGCTTGGTATTGGGAACGGTCCGTGCGAAG GCGGGCCTTCCTCSAAGACCTCGGCGGGGTTCAACCAACTTCGGGCGT AGTAGAGTTAAATCGAACGTCTTATAAGCTTGGTCGGATCTSATTGCCG TTAAACCTTTAAATTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC GCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
	3	<u>nicht editierbar</u>

Fortsetzung Tabelle 57: Erhaltene Sequenzinformationen nach Sanger-Sequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
77,2 %	1	<u><i>Wallemia muriae</i> (546 nt)</u> AAGGATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGATAAAAACTCATAATCTTCTA CAAACCACTGTTTTAAAATGTTTACTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGT TGAAATATTTAAAAGTTTTATAAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTCA GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA GATACAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAAAATGGCACTCTATGGTATT CCGTAGAGTACGTCTGTTTGAGCGTCGCGAACATCTCCATAATTAGTTT TTCTAATTAAGGGTTTTGAGGTTGTCATTGTATAGTGACTCCCTTTAAA TGATTAGTGATGACCTTATGAATGGGTTAATACTGTGTGTATAATGGAT TACATCCATCACCAGTCAGAGAGTAATCTCGCCTTAGTAATTTGTAGTGA TTGCTTCTAATAGCCTTTATTGGCAAATTAATGATCAAATCGACCTCA AATCAGATGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG
	2	<u><i>Wallemia muriae</i> (550 nt)</u> AAGGATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGATAAAAACTCATAATCTTCTA CAAACCACTGTTTTAAAATGTTTACTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGT TGAAATATTTAAAAGTTTTATAAACTTTTCASCAACGGATCTCTTGGTTCA GCATCAATGAAGAACGCASCAGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCARA TACAGTGAATCATCGAATCTTTGAMCGCAAAATGGCACTCTATGGTATTC CGTAAAGTACGTCTGTTTGASCCTCGCGAACATCTCCATAATTAGTTTTT TTAAATTAATTAAGGGTTTTGAGGTTGKCAATGKATTATGACTCCCTTTAA ATAATTARTGATGACCTTATGAATGGGTTAATACTGKGTGKTAWAAWG GATTAMATCCATCACCAGTCARARAGTAATCTCGCCTTAATAATTTGATA GTGATTGCTTCTAATCCCCTTTATTGGCAACCTAATGATCAAATCGACCT CAAATCAGATGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAG G
	3	<u><i>Botryotinia fuckeliana</i> (517 nt)</u> AAGGATGATTACAGAGTTCATGCCCGAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGT GTATTACTTTTGTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGGCCTTGTATGCT CGCCAGAGAATACCAAACTCTTTTTATTAATGTGCTCTGAGTACTATAT AATAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCAT GCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTTAGCTTGGTATTGAGTC TATGTCAGTAATGGCAGGCTCTAAAATCAGTGGCGGCGCCGCTGGGTC CTGAACGTAGTAATATCTCTCGTTACAGGTTCTCGGTGTGCTTCTGCCA AAACCCAAATTTTCTATGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT GAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGG

Gelpositionen mit inverser Assoziation zu Asthma sind fett gedruckt.

Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	1	<u><i>Exophiala</i> sp. (557 nt)</u> AAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCCGCAGCCCGACCTCCCAACC CTTTGTCTAATTTACCTTGTCTGTTGCTTCGGCGGACCGGTTGACCAACT GGTCTTGACCGCCGGGGGGTTCGTCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACG GCCCAACCACAACTCTTGTACCAAACCATGTCGTCTGAATTACTTGATT AAAATCAAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTTCC GTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGT GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGTGTTTGG TGTTGGGCCCGCGTTCCTGCGAAGGAACTGGCCTCAAAGACAATGACG GCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACGAGCTTTCAGGAGCACGCGCCG AGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCTAACCCTTTTTTACTTATAAGGT TGACCTCGGATCAGGTAGGAAC
	2	<u><i>Exophiala</i> sp. (557 nt)</u> AAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCCGCAGCCCGACCTCCCAACC CTTTGTCTAATTTACCTTGTCTGTTGCTTCGGCGGACCGGTTGACCAACT GGTCTTGACCGCCGGGGGGTTCGTCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACG GCCCAACCACAACTCTTGTACCAAACCATGTCGTCTGAATTACTTGATT AAAATCAAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTTCC GTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGT GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGTGTTTGG TGTTGGGCCCGCGTTCCTGCGAAGGAACTGGCCTCAAAGACAATGACG GCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACGAGCTTTCAGGAGCACGCGCCG AGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCTAACCCTTTTTTACTTATAAGGT TGACCTCGGATCAGGTAGGAAC
	3	<u><i>Exophiala</i> sp. (557 nt)</u> AAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCCGCAGCCCGACCTCCCAACC CTTTGTCTAATTTACCTTGTCTGTTGCTTCGGCGGACCGGTTGACCAACT GGTCTTGACCGCCGGGGGGTTCGTCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACG GCCCAACCACAACTCTTGTACCAAACCATGTCGTCTGAATTACTTGATT AAAATCAAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTTCC GTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGT GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGTGTTTGG TGTTGGGCCCGCGTTCCTGCGAAGGAACTGGCCTCAAAGACAATGACG GCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACGAGCTTTCAGGAGCACGCGCCG AGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCTAACCCTTTTTTACTTATAAGGT TGACCTCGGATCAGGTAGGAAC

Fortsetzung Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	5	<i>Exophiala</i> sp. (557 nt) AAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCCGCAGCCCGACCTCCCAACC CTTTGTCTAATTTACCTTGTCTGTTGCTTCGGCGGACCGGTTGACCAACT GGTCTTGACCGCCGGGGGGTTCGTCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACG GCCCAACCACAACTCTTGTACCAACCATGTCGTCTGAATTACTTGATT AAAATCAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTTCC GTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGT GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGTGTTTGG TGTTGGGCCCGCGTTCCTGCGAAGGAACTGGCCTCAAAGACAATGACG GCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACGAGCTTTT CAGGAGCACGCGCCG AGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCTAACCCTTTTTTACTTATAAGGT TGACCTCGGATCAGGTAGGAAC
	6	<i>Exophiala</i> sp. (557 nt) AAGGATCATTACCGAGTTAGGGTTGCTCCGCAGCCCGACCTCCCAACC CTTTGTCTAATTTACCTTGTCTGTTGCTTCGGCGGACCGGTTGACCAACT GGTCTTGACCGCCGGGGGGTTCGTCCCCTGGAGAGCGTCCGCCGACG GCCCAACCACAACTCTTGTACCAACCATGTCGTCTGAATTACTTGATT AAAATCAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTTCC GTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCACTGGTATTCCGGT GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATCCTCCCTCAAACCCCGTGTTTGG TGTTGGGCCCGCGTTCCTGCGAAGGAACTGGCCTCAAAGACAATGACG GCGTCCGCGGGACCCTCGGTGCAACGAGCTTTT CAGGAGCACGCGCCG AGTTTCAAGGTCCCCCGGGCCGGTCTAACCCTTTTTTACTTATAAGGT TGACCTCGGATCAGGTAGGAAC
	7	<i>Chaetodiplodia</i> sp. (472 nt) AAGGATCATTACAAGATATGACGGCGAGGTCGGGGCTCAAAGTGCGTGT AACCCATGTGCTTTGTCTGCTGCTCTGAATATTCTACCCATGTCTTTT GCGTACTATTCGTTTCCTCGGCAGGCTTGCCTGCCGATTGGACACTATA AAACCTTTTGTAAATTGCAGTCAGCGTCAGAAATAACTTAATAGTTACAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGC GTCATTTGTACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT TTGCGCGTGGACTCGCCTTAAAGCGATTGGCAGCCGGCATATTGGCCT TGGAGCGCAGCACATTTTGCCTTTCGAGCCA
	8	<i>Aureobasidium pullulans</i> (532 nt) AAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTT GTTGTTAAAACCTACCTTGTGCTTTGGCGGGACCGCTCGGTCTCGAGCC GCTGGGGATTCTGCCAGGCGAGCGCCCGCCAGAGTTAAACCAAACCTC TTGTTATTTAACCGGTCGTCTGAGTTAAATTTTGAATAAATCAAAAACCTT CAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC ATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCGTCTGCTTGGTGGG CGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAG AATTTATTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGAACTCTGCCGACTGAAACC TTTATTTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG

Fortsetzung Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	9	<i>Penicillium commune</i> (544 nt) AAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGT GTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCCGG GGGGCTCACGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACT CTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAAATTTCA ACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC GATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGC ACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCTCCGATCTC CGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTC GAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTT GCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA TACCCGCTGTAAC
	10	<i>Penicillium spinulosum</i> (519 nt) AAGGATCATTACTGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGT GTTTATTGTACCTTGTTGCTTCGGTGCGCCCGCCTCACGGCCGCCGGG GGGCTTCTGCCCCCGGGTCCGCGCGCACCCGGAGACACTATTGAACTCT GTCTGAAGATTGCAGTCTGAGCATAAACTAAATAAGTTAAAATTTCAAC AACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCCA TAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCA CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCTCCGTCCCCCGGGGAC GGGTCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGAGTCCGGTCTCGAGCGTATG GGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCCAGCCGACAAC CAATCATCCTTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGGTA
	11	<i>Aureobasidium pullulans</i> (532 nt) AAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTT GTTGTTAAAACCTACCTTGTTGCTTTGGCGGGACCGCTCGGTCTCGAGCC GCTGGGGATTTCGTCACAGGCGAGCGCCCGCCAGAGTTAAACCAAACCT TTGTTATTTAACCGTCTGAGTTAAAATTTTGAATAAATCAAACCTTT CAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAGCGTC ATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCGTCTCCTTAGTTGGG CGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAG AATTTATTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGAACTCTGCCGACTGAAACC TTATTTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG
	12	unkultivierter Pilz (495 nt) AAGGATCATTATCGAGTGAGGGGTTCTCTGGGCCCCATCTCCAACCCTT GTCTATTCTATCACGTTGCTTTGGCGGGCCCATCCCTTAGCGGATCGCC GGAGGGTCTCCCCCGGCCGTGCCCGCCAGTAGCCCCACAAATTCT TCAGTAGTGATGTCTAAGTCTTAAACAATAAGTAAAATTTCAACAA CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA GTAATGCGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA TTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATC AACCCTCAAGCCCGGCTTGTGTTGGGTCCCGCCGCTGCAACACGTGG TGGATCCGAAAGATAATGGCAGAGCCCGCGGGGACCCTGGACGCAAC GAGCCTTGTGGCACGCGTCTGGGCGGTCTTCCGGCTCGGTCTTAACCA CATCTACTT

Fortsetzung Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
621/627	13	<i>Aureobasidium pullulans</i> (532 nt) AAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTT GTTGTTAAAACACTACCTTGTTGCTTTGGCGGGACCGCTCGGTCTCGAGCC GCTGGGGATTTCGTCCAGGCGAGCGCCCGCCAGAGTTAAACCAAACCTC TTGTTATTTAACCGGTCTGCTGAGTTAAAATTTGAATAAATCAAACCTTT CAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC GCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTGAGCGTC ATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCGTCTCCTTAGTTGGG CGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAG AATTTATTCGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGAACTCTGCCGACTGAAACC TTATTTTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG
	14	<i>Phialophora europaea</i> (542 nt) AAGGATCATTACCGAGTTAGGGTGCCTAAACCGCGCCCGACCTCCAAC CCTTTGTCTACCTGACCTTATGTTGCTTCGGCAGGCCCGCCTTCCCCTC CGGGGAGGCCCGCCGGGGGTCCGCAAGGACCCCGGGCCCGCGCCTGT CGACGGCCCTCATACCTAAACTATTGTTAAAACGTGTCGTCTGAGTTAT CTAAACAAATGAAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAAAT CCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCG GAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTATCACCCCTCAAGCCCGGCTTG TTGTTGTTGTAGCGGCCCCCGCTCTTCCCAAAGATAATGACGGCGT CTGTGAGGACTCCTGTACTGAGCTTTCCGGGCACGTAAGGCTAGA ACTTCAGACCCGGTCACCGTCCCCTCTGGGGACACTATTTTACCAAGGT TGACCTCGG
	15	unkultivierter Pilz (547 nt) AAGGATCATTACCGAGTAAGGGTCTTCTAGGCCCGACCTCCCACCCTTT GTCGTGCAACAAATCTTGTGCTTTGGCGGGACCGTCCGCCCTCACGG GTCGGCTGCCGGTCCCGACCGGGTAAGCGCCCGCCAGAGACCAAC TAAACTCTTCGTTAAAACACTTCGTCTGAGTAAATGATTTAATCAATCAA AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCCG AGCGTCATTACACCAATCAAGCTCAGCTTGGCATTAGGTCTTTCTGCCG CGGTCAAACGCGGGCGGGCCTCAAACCTTTCCGGCGGAGTCAATCCGG CTTCGGGCGTAGCAGAATCTGTCAAACGTCCGTGTGGCCGGGTGGTC TTCAGCCGCCAAACCCCATACATTTTTTAAAGGTTGACCTCGGATCAGG TAGGAATACCCG
	16	<i>Penicillium brevicompactum</i> (522 nt) AAGGATCATTACCGAGTAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGT GTTTATTTACCTTGTGCTTCGGCGAGCCTGCCTTTTGGCTGCCGGGGG ACGTCAGTCCCCGGGTCCGTGCTCGCCGGAGACACCTTAGAACTCTGT CTGAAGATTGTAGTCTGAGATTAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAA CGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA CGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC ATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCTTCCGGGG GACGGGTCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCAAGCGT ATGGGGCTTTGTACTCGCTTTGTAGGCCTGGCCGGCGCTTGCCGATC AACCAAACCTTTTTATCAGGTTGACCTCGGATCAGGGTA

Fortsetzung Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
1132	1	<u><i>Monodictys castenae</i> (521 nt)</u> AAGGATCATTATCGTGGGGCTCCGGCCCCGTCGAGATAGAACCCTTGC CTTTTCGAGTACCGTCCGTTTCCTCGGCAGGCCCGCCTGCCAATGGGG GACCCCAAACAAACCCTTTTTGTACCTGTACCAAGTCTGAACAACAAACA AAAATTAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCTTAGGGCATGC CTGTTTCGAGCGTCATTTACAACCTTCAAGCTCCGCTTGGTGTGGGTGTC TGTCCCGCCCCCGGGTGC GGACTCGCCTCAAATTCATTGGCGGCCGGT ACATTGGCTTCGAGCGCAGCAGAAACGCGAACTCGAGGACGGTGGATC CGCTCCCAGAAGCCAACCCCATATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
	2	<u><i>Sporobolomyces lactosus</i> (509 nt)</u> AAGGATCATTAAAGAGACGTACGCCCTTCGGGGTATACCTCCCACCCTT TGTTTATATTACCTGTGTTGCTTTGGCTGACCTGCCCTTGGGCTCCCGG CTTCGGCTGGGTGCGTGTGAGCCAGAGGAATATCAAACCTCTGATTGTATT TATTGTCTGAGTAATAACTTAATAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTT GGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAA TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCCC TGGTATTCCGGGGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAAG CTCTGCTTGGTATTGGGCTCTGCTGGAAACGGCAGGCCTTAAATCAGT GGCGGTGCCTCTCGGCTCCAAGCGTAGTAATTCTTCTCGCTTCGGATCA CCGGGTGTGTGCTTGCCAACAACCCCAATTTTTAAGGTTGACCTCGG ATCAGGTAGGGATACCCG
	3	<u>unkultivierter Pilz (523 nt)</u> AAGGATCATTACCGAAGTACAGGCCCTTCGGGGGCTACACTTCCACC CTTTGTTTACCACACACGTTGCTTTGGCGGGCCGCCTAGCTACTGGCTT CGGCTGGTAAGTGCCCGCGGAGAACCCCAAACCCAAACCATTTTACC GTGTCGTCTGAATACAAGTTTAAATATTTAAACTTTCAACAACGGATCT CTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC CCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTATCACCCCT CAAGCTCAGCTTGGTGTGGGGCCTGCCGTCACAGGCAGCCCCTAAAA GCAGTGGCGGTGCCGTCAGGCTCTAAGCGTAGTAATACTCCTCGCTAT AGGGTCCTGGTGGTGTCTGCCAAAACCCCAATTTTTCATGATTGACC TCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA
1410	1	<u><i>Saccharicola bicolor</i> (488 nt)</u> AAGGATCATTAAATTACGAAAGCTATAGCCCCTTCGGGGGTTATTGCATC CACCCCTTGTCTACGTGTACCTCTTGTGTTTCTCGGCAGGCTTGCCT GCCGCCAGGAATCCCTTAAACTCTTGTATTTACAGTATTAATCTCTGA TAACTATTTAAATTATTACAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGTAGTGTGAATTGCAGAATT CCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCGGTATTCCG TGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGT GTTGGGCGTCTGTCCCGCTTCATGCGTGGACTCGCCCAAAGTCATTG GCAGCGGTGCTGCCAGCTTCTCGCGCAGCACATTTGCGTTTCTTGAAG TTTGGTGGATCAGCATCCAGTAAGCTCTTTTATGACTTGACCTCGG

Fortsetzung Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
1410	2	<i>Ascomycota</i> sp. (488 nt) AAGGATCATTACTTTTCAGTACTTTGGGGGCTGTCAGTCTATATCACTATA GCAAGCCTCCGTCTGAAACCCTTGTCTTTTGGCGTACCTTATGTTTCCTC GGCGGGCTTGCCCGCCGTTGGACAACCTTTAAACCTTTTTAATTTTCA ATCAGCGTCTGAAAAACATAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCT TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTG AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAA GCTATGCTTGGTGTGGGTGTTTGCCTCTCCTTTTGGCATTGGACTCG CCTCAAAGACATTGGCAGCCAGTGTATTGGTCTTGAAGCGCAGCACATT TTGCGATTCTTGCTGATAATCACTAGCATCCAGTAAGCCTCTTTAT
	4	<i>Didymella exitialis</i> (484 nt) AAGGATCATTACCGAGAGTTGCAGGCTTTTGTCTGCCATCTCTTACCCA TGTCTTTTGGTACTACACGTTTCCTCGGCAGGTCCGCCTGCCGTTAGG ACCACATTAACCATTTGCAGTTGCAGTCAGCGTCTGAAAACTTAATAA TTACAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG CAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTG TTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGT CCCGCCTTTGTGCGCGGACTCGCCTTAAAGCAATTGGCAGCCGGCGTA TTAGTTTTCGGAGCGCAGCACAAATCGCGCTCTGTGTCTTATACGGTAGC ATCCATCAAGACTATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGGTA
	5	<i>Lichinella iodopulchra</i> (465 nt) AAGGATCATTACCCTTTGCTTATGGCACTCCTTAGGCCTAGCCTTAGGT TTGCCCTGGCAATAAACCTTGACCTGGTCTACCATATGTCTGTCCCTT GGCAGGCTTGTGCCTGCCATGGGCGTTACACAAACCTTTGAATAGCAG CCTACAATCCTTCTGAGCAATGCTAAATTATCACAACCTTTCAACAATGGA TCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAG TGTGAATTGCAGACTTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATATTGCG CCTTTTGAATTCCAATTGGCATGCCTGTTTGAAGCGTCATATACTCCCTC AAGCGTTGGCTTGGTGTGGGCAACTGTCCTATGCACAGCAAGGACTT GCCTCAAAGTATTGGCTGTTGGCCTACCAGCTCCTTGCAGCAGCACTTGG GTGTTTTGAGGCTAGGTAATAGG
34,7 %	1	<i>Leptosphaerulina chartarum</i> (498 nt) AAGGATCATTAAACCTTTCAAACAGGGTGCGTGCGCGGCCCCCGAGGTG CGGAAACAAGCCTCGAGCGTTTTGGGGTCTCCCTTACGCGCGCAC GACTGCCATCCTTACTTTACGAGCACCTTCTGTTCTCCCTCGGCGGGGC AACCTGCCGTTGGAACCGAATAAACTCTTTTTGCATCTAGCATTACCTGT TCCGAAACAACAATCGTTACAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAG AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGTAT TCCGTGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGC TTGGTGTGGGCGTCTGTCCCGCCTCCGCGCGTGGACTCGCCCCAAAT TCATTGGCAGCGGTCTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACATTGCGCTTCTT GAGGGGCTTCC

Fortsetzung Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
34,7 %	2	<u>unkultivierter <i>Ascomycota</i> Klon (542 nt)</u> AAGGATCATTAAAGAGTAAGGGTCTCTGGCCCCGAACCTCCAACCCTCTG TTGTTATAACTACTTTCGTTGCTTTGGCGGGACCGCGAAGGTTCTCCCGA GCGCGCCAGTCTCCGGACAGGCGAGCGCCCGCCAGAGTCTAACCAA CTCTTGTTTTAAACCAGTCTGCTCTGAGTATAAAATTTTAAATTAATAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGC GTCATTACACCACTCAAGCACCGCTTGGTATTGGGCATCGTCCGTCCGAA AGGCGGGCGTGCCTCGAAGACCTCGGCGGGGTTTCTCCAACCTTCGGG CGTAGTAGAGTTAAATCAAAACGTCTTATAAGCTTGGTGAGATCTCATTG CCGTAAACCTTTTAAATTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC CCG
	3	<u><i>Chaetodiplodia</i> sp. (472 nt)</u> AAGGATCATTACAAGATATGACGGCGAGGTCGGGCTCAAAGTGCGTGT AACCCATGTGCTTTGTCTGGCCTCTCTGAATATTCTACCCATGTCTTTT GCGTACTATTCGTTTCCTCGGCAGGCTTGCCTGCCGATTGGACACTATA AAACCTTTTGTAAATTGCAGTCAGCGTCAGAAATAACTTAATAGTTACAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG AACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGC GTCATTTGTACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCCCGCCT TTGCGCGTGGACTCGCCTTAAAGCGATTGGCAGCCGGCATATTGGCCT TGGAGCGCAGCACATTTTGCCTTTCGAGCCA
42,9 %	1	<u><i>Septoria lycopersici</i> (505 nt)</u> AGGGATCATTACTGAGTGAGGGCCTTCGGGCTCGACCTCCAACCCTTT GTGAACACAACCTTGTGCTTCGGGGGCGACCTGCCGTTTCGACGGCG AGCGCCCCGGAGACCTTCAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTTTAA GTAAATTAACAAAACCTTCAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG AATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAAGGG CATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGG GCGCCGCGGTCAATCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCGGCTGAGCTGTCC GTCTCTAAGCGTTGTGATTTCAATTAATCGCTTCGGAGTGCGGGCGGTGC CGGCCGTTAAATCTTTCAACAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC CGCTGAACCTTAAGCATATC
	2	<u>unkultivierter <i>Ascomycota</i> Klon (495 nt)</u> AAGGATCATTACTGCTTGCTCATGGCCGTCCTCGGGGGCAACCCCTTG GGCGGTACGGCAACAACACCCTTGTCTATGTATACCTTTTGTATTTC TCGGCGGGGTACCCCGCGCTGGGGACACCAACCCTCTTGCATGAA GCATCAAACCTTCTGAACAAACCTAAATTATTACAACCTTCAAACAATGGA TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAG TGTGAATTGCAGACTTTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG CCCCTTGGTATTCCATTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACACCCT CAAGCTACGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCCCGCTTTTTCGAGGACT CGCCCCAAATCCATTGGCAGCGGCATCGCCGGCTTCTCGCGCAGCACA TTGCGCTCAAGAAGGCTCCCGGCGGGCTCGCGTCCAGCAAGAACCCC CCAGTTTGA

Fortsetzung Tabelle 58: Erhaltene Sequenzinformationen (dominante Sequenz) nach Parallelsequenzierung von ausgewählten Polyacrylamidgelbanden von signifikant mit Asthma assoziierten Gelpositionen nach densitometrischer Auswertung und Bandmatching-Analyse der Bandeninformation

Gel-position	Probe (≙ Kind)	Sequenz (5' → 3')
42,9 %	3	<u>unkultivierter <i>Ascomycota</i> sp. (511 nt)</u> AAGGATCATTACCCATATGAAAGCTGGCAGGGAGCCCAGACAACACTT GTGTTTCTGCCCTGTCTGCCTGATTATCCACCCATGTCTTTTGCCTACTA CTTGTTTCTCGGTGGGCTTGCCCGCCGATAGGACACCACATCAACCC TTTGCAATTGCAGTCAGCGTCAGAAAAACATAATAGTTACAACCTTTCAA CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG ATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC ACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT TGTACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCCCCAGGGGACT CGCCTTAAAATTATTGGCAGCCGGCATACTGGTTTCGAGCGCAGCAC ATTTTGCCTTCTGGCCCTGCATGCTGGCGTCCA
53,0 %	1	<u><i>Epicoccum nigrum</i> (495 nt)</u> AAGGATCATTACCTAGAGTTTGTAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCCA TGTCTTTTGTAGTACCTTCGTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGA CAACATTCAAACCTTTGCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATA GTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC GCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCT GTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTG TCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGCCGGCGTA TTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGAC GTCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC CCG
	2	<u><i>Sydowia polyspora</i> (540 nt)</u> AAGGATCATTAAAGAGATAGGGTCTTCATGGCCCGACCTCCAACCCTCT GTTGTTAAAACCTACCTTGTGCTTTGGCGGGACCGTCTCGGTCTCCGAG CGCACTAACCTCGGGTGGTGGAGCGCCCGCCAGAGTCCAACCAAACCT CTTGATTAACAGTCGTCTGAGTATAAAATTTTAAATTAATTAACCTT TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAA CGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT CATTACACCACTCAAGCATCGCTTGGTATTGGGAACGGTCCGTTCGCAAG GCGGGCCTTCTCGAAGACCTCGGCGGGGTTCAACCAACTTCGGGCGT AGTAGAGTTAAATCGAACGTCTTATAAGCTTGGTCGGATCTCATTGCCG TTAAACCTTAAATTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC G
77,2 %	1	<u><i>Wallemia muriae</i> (499 nt)</u> AAGGATCATTAGTGATTAATTATTGAGTGATAAAAACCTCATAATCTTCTAC AAACCACTGTTTTAAATGTTTACTAGAATGTCCAAGCAGTTAAGCTGTT GAAATATTAAGTTTTATAAACTTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTCAG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA TACAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAATGGCACTCTATGGTATTCC GTAGAGTACGTCTGTTTGGAGCGTCGCGAACATCTCCATAATTAGTTTTTC TAATTAAGGGTTTTGAGGTTGTCATTGTATAGTGACTCCCTTTAAATGA TTAGTGATGACCTTATGAATGGGTTAATACTGTGTGTTATAATGGATTAC ATCCATCACCAGTCAGAGAGTAATCTCGCCTTAGTAATTTGTAGTGATTG CTTCTAATAGCCTTTATTGGCAAATTAATGATCAAATCGACCTCAA

Gelpositionen mit inverser Assoziation zu Asthma sind fett gedruckt.

10.2 Anhang B: Abbildungen

10.2.1 Anhang B1: DNA-Extraktionsverfahren

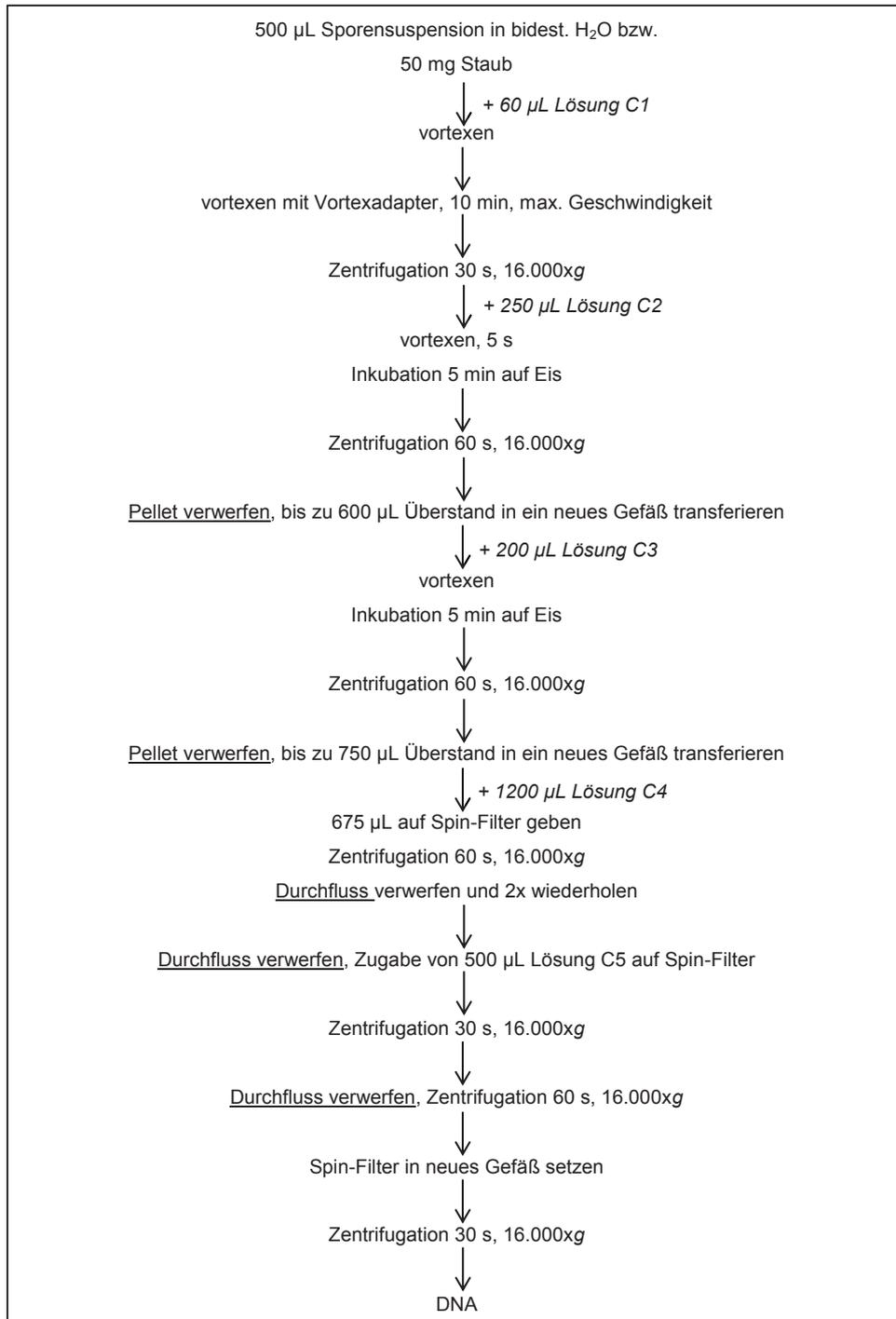


Abbildung 22: DNA-Extraktion mit PowerSoil™ Isolation Kit (MOBIO)

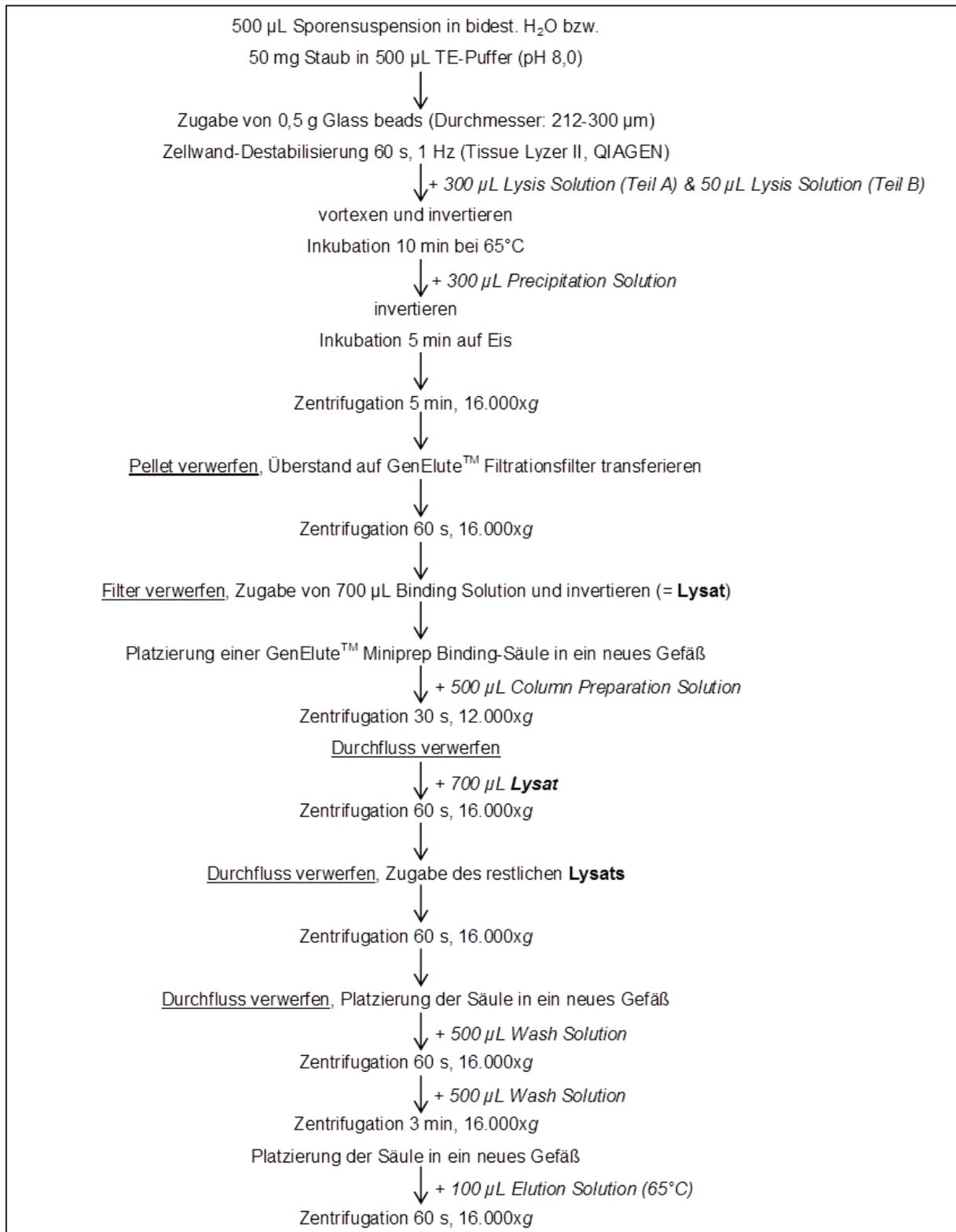


Abbildung 23: DNA-Extraktion mit GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA)

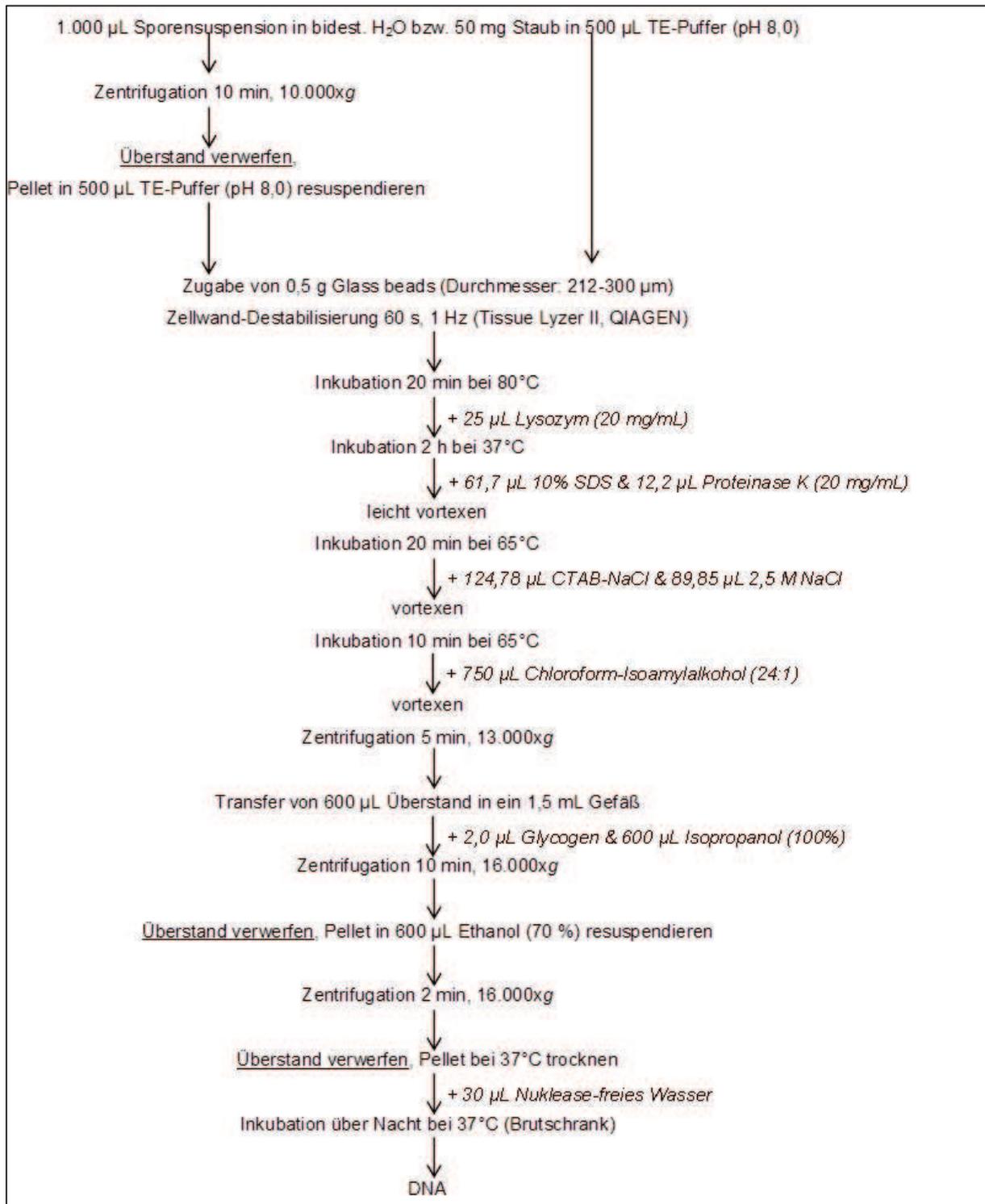


Abbildung 24: DNA-Extraktion mit CTAB nach KORTHALS ET AL. (2008A) mit Modifikationen

10.2.2 Anhang B2: DNA-Aufreinigungsverfahren

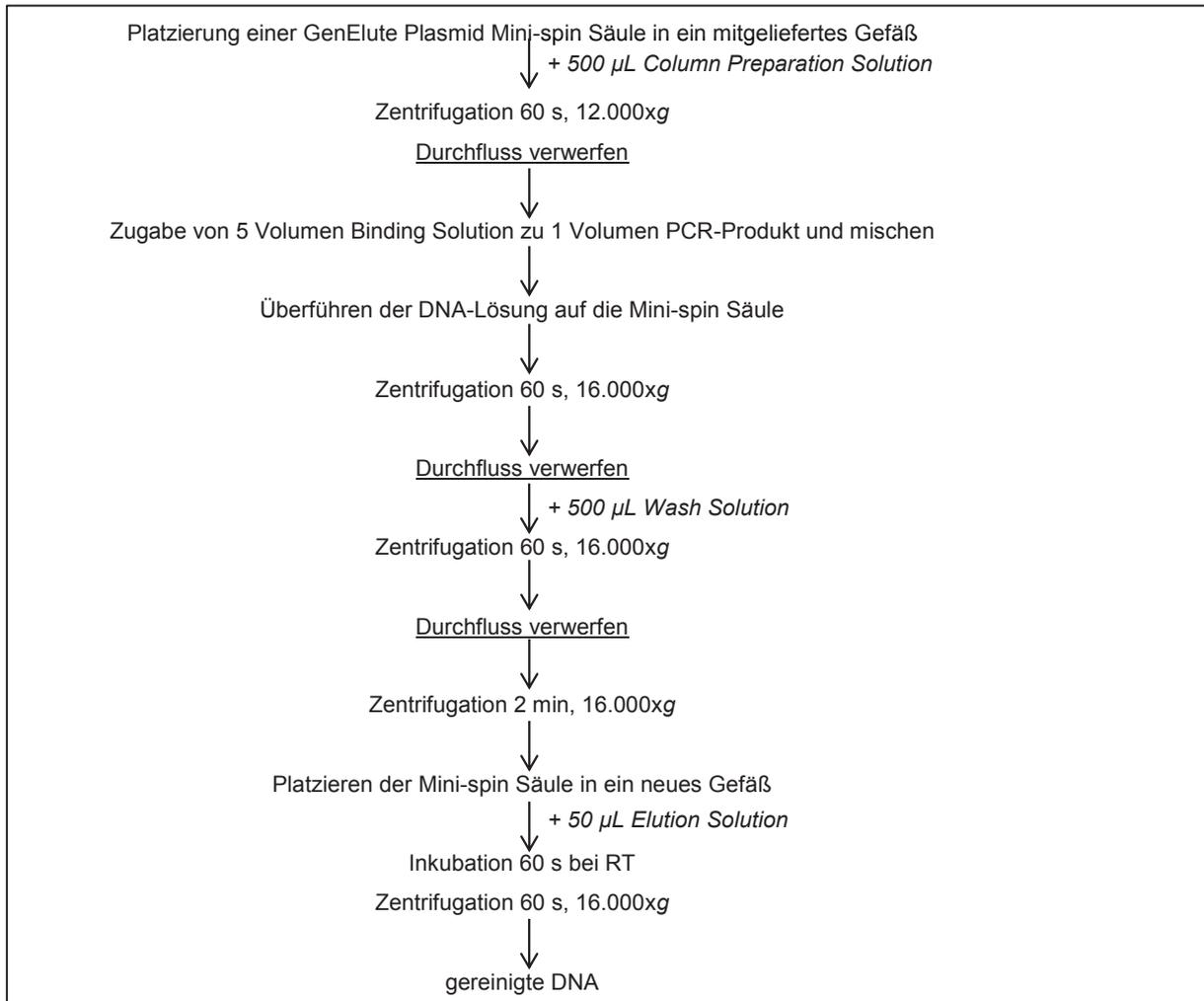


Abbildung 25: Aufreinigung von PCR-Produkten mit GenElute™ PCR Clean-up Kit (SIGMA)

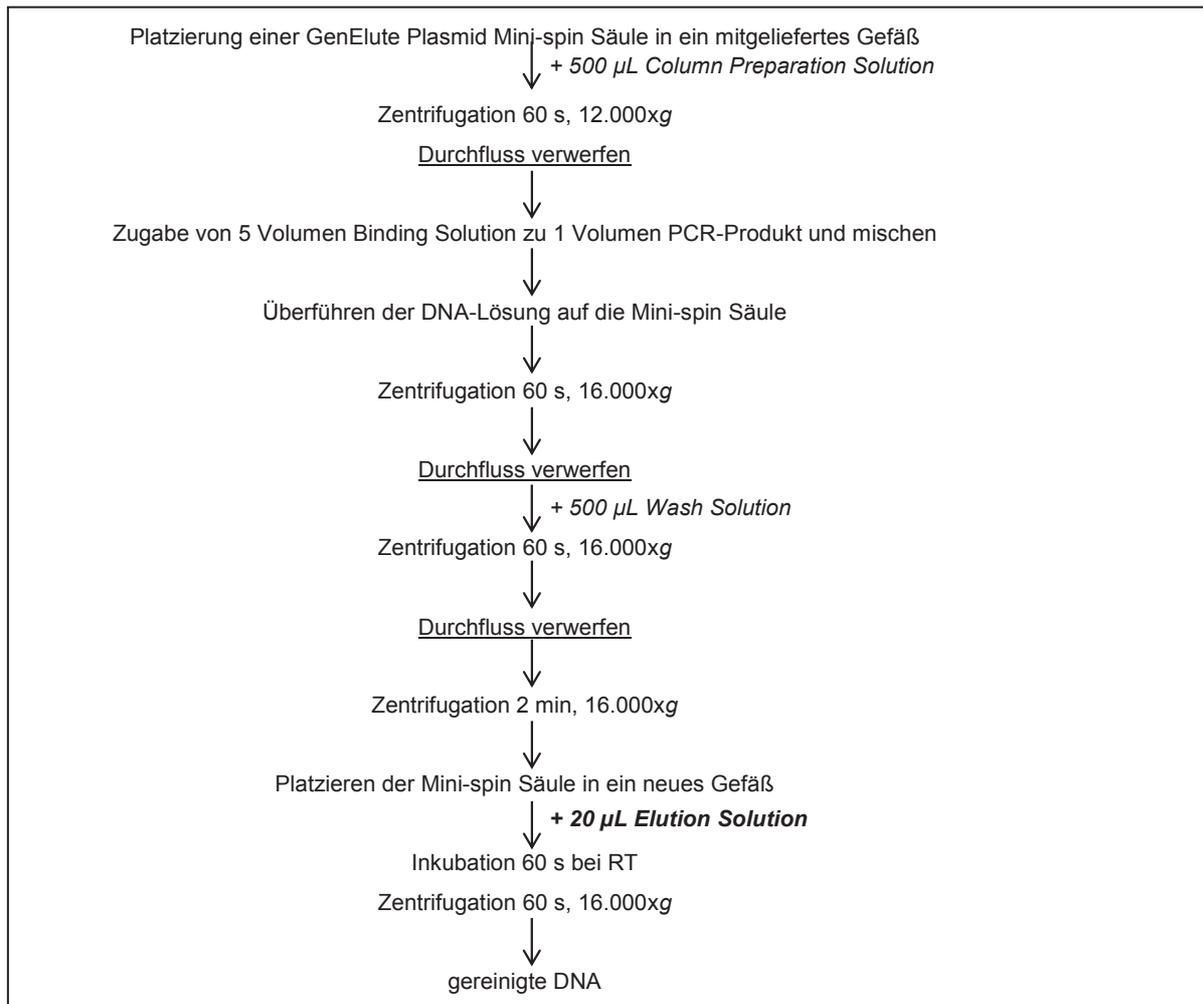


Abbildung 26: Aufreinigung von einzelsträngiger DNA mit GenElute™ PCR Clean-up Kit (SIGMA).

Modifikationen gegenüber den Herstellerangaben sind fett gedruckt.

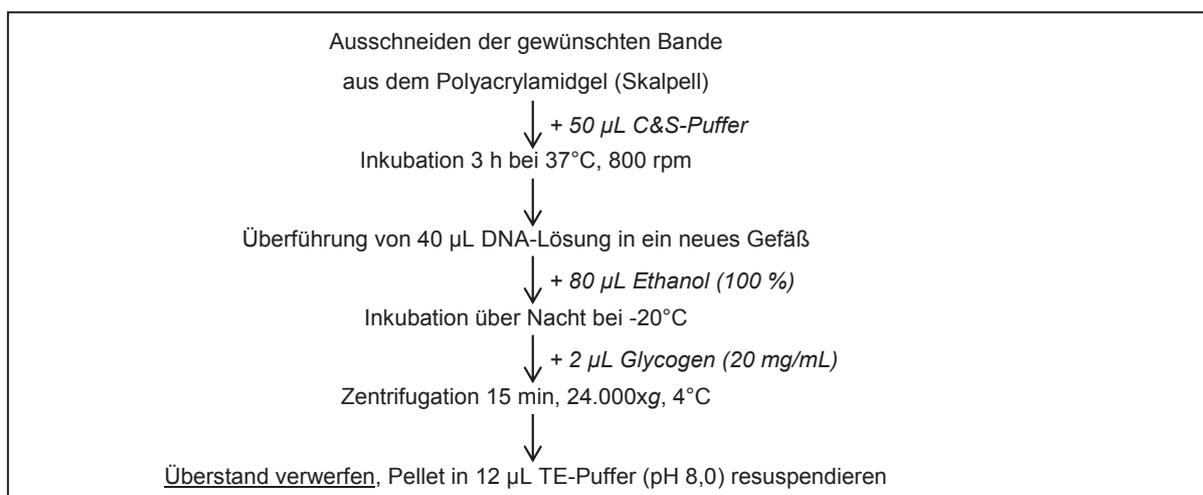


Abbildung 27: Aufreinigung von einzelsträngiger DNA aus einem Polyacrylamidgel durch „Crush & Soak“ (PETERS ET AL., 2000)

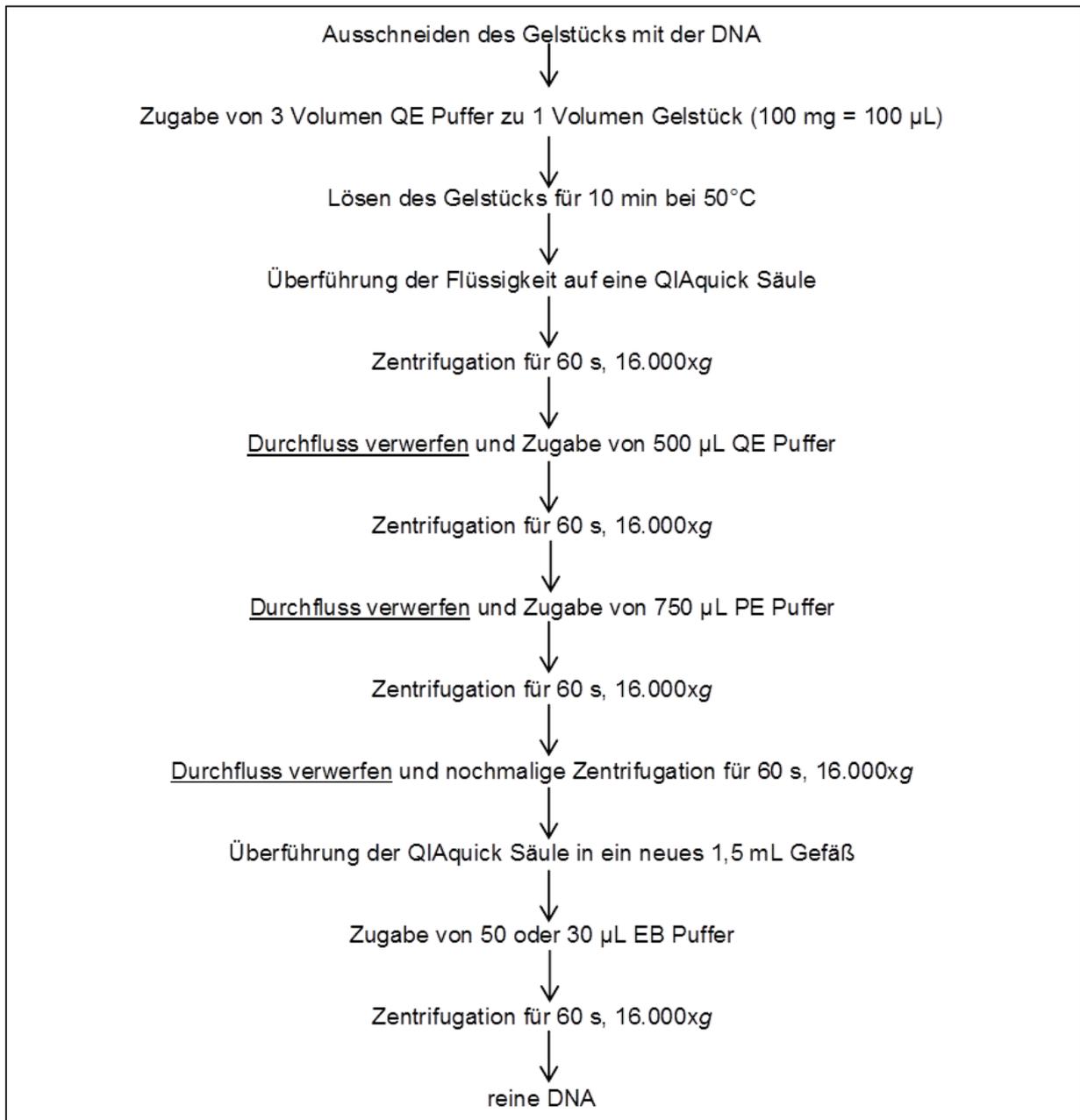


Abbildung 28: Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel mit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

10.2.3 Anhang B3: Next Generation Sequencing

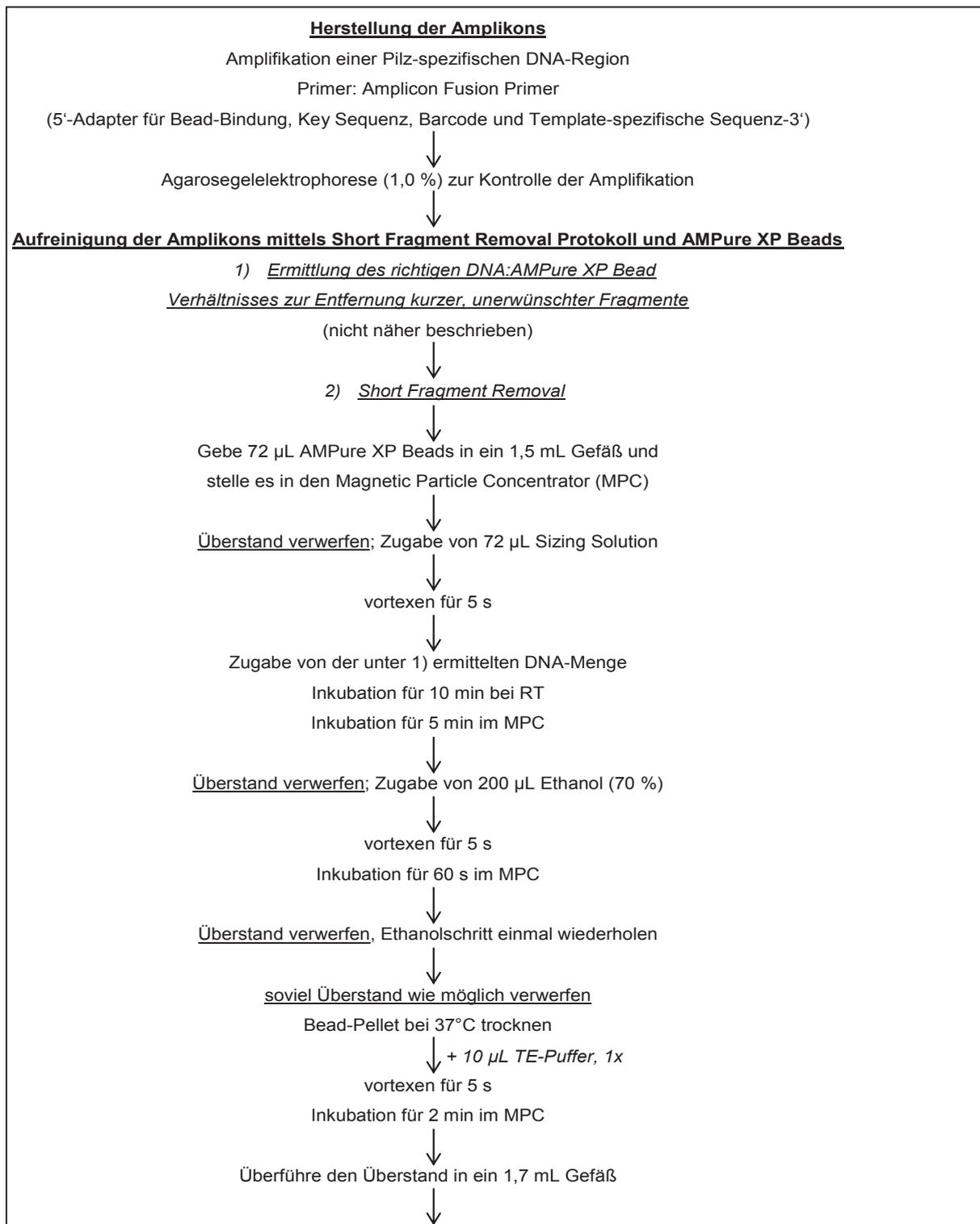
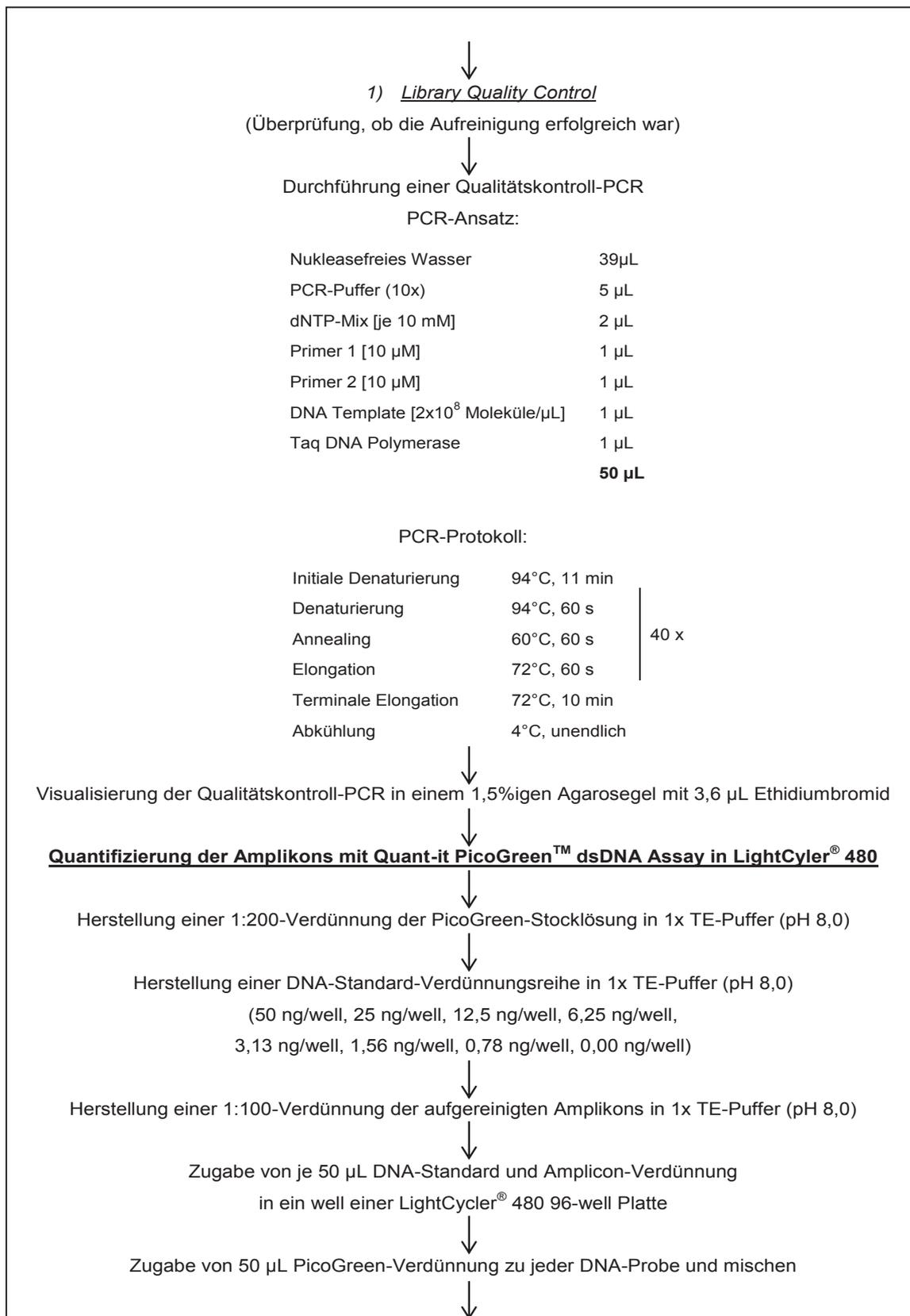
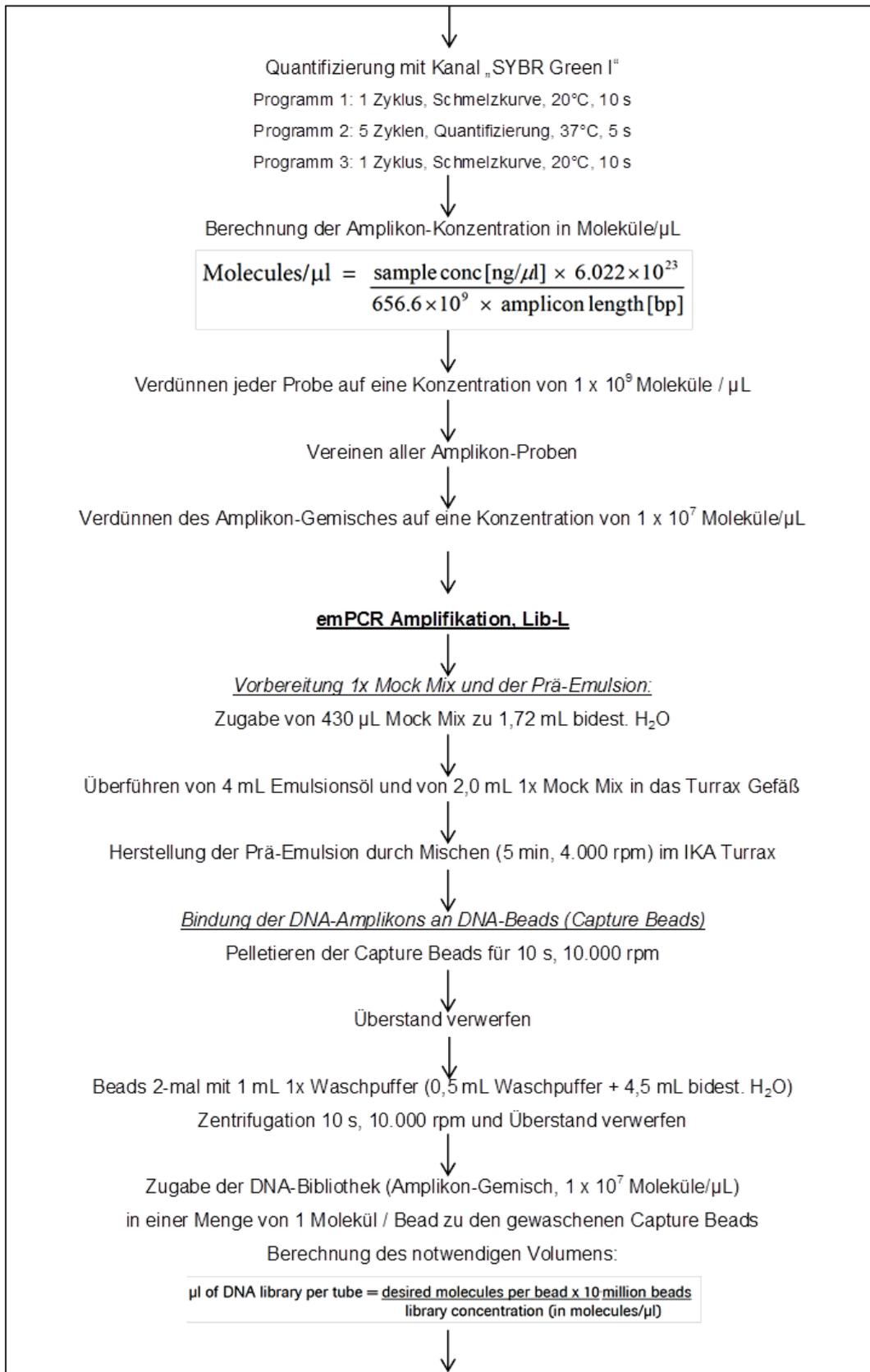


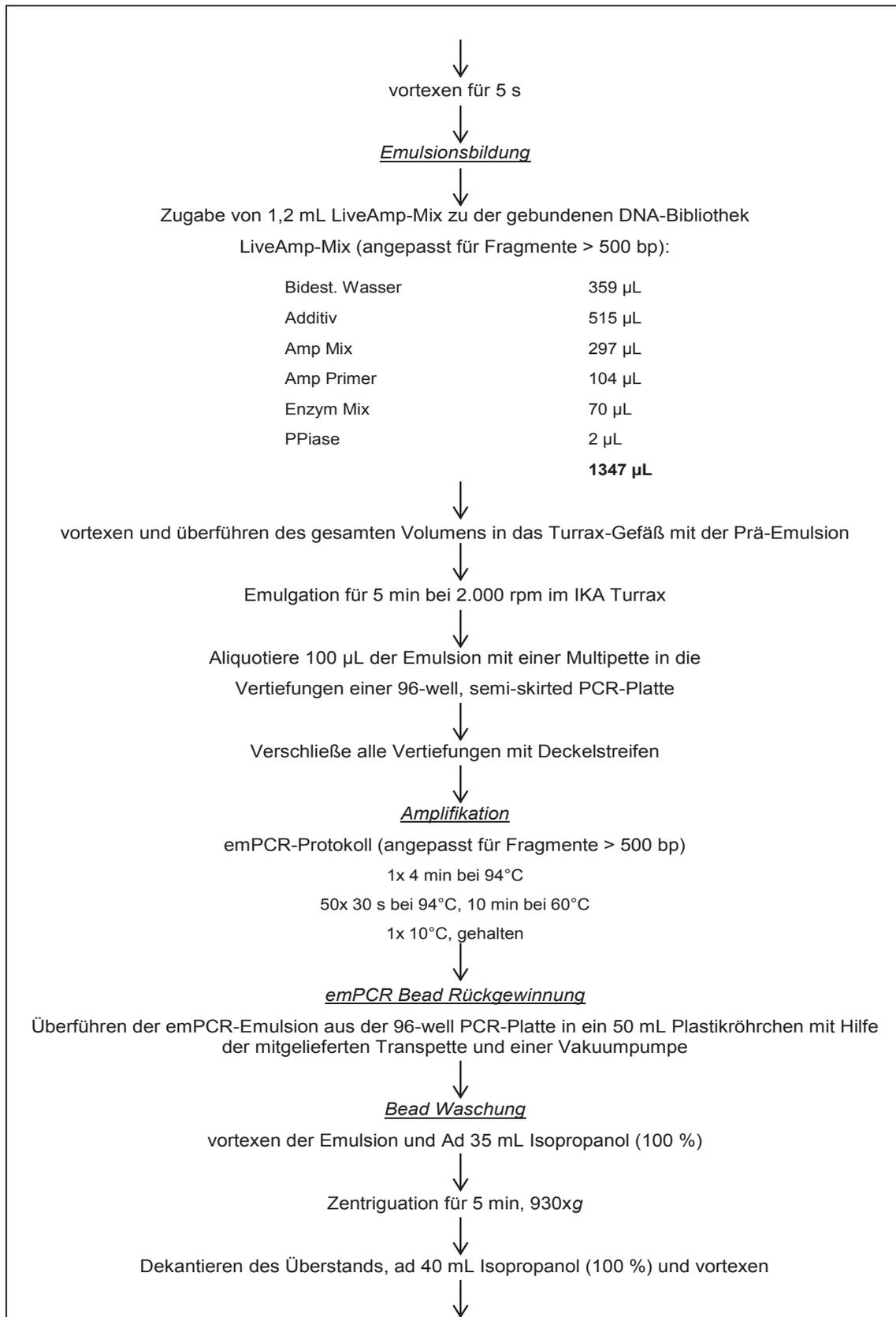
Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplification und Sequencing



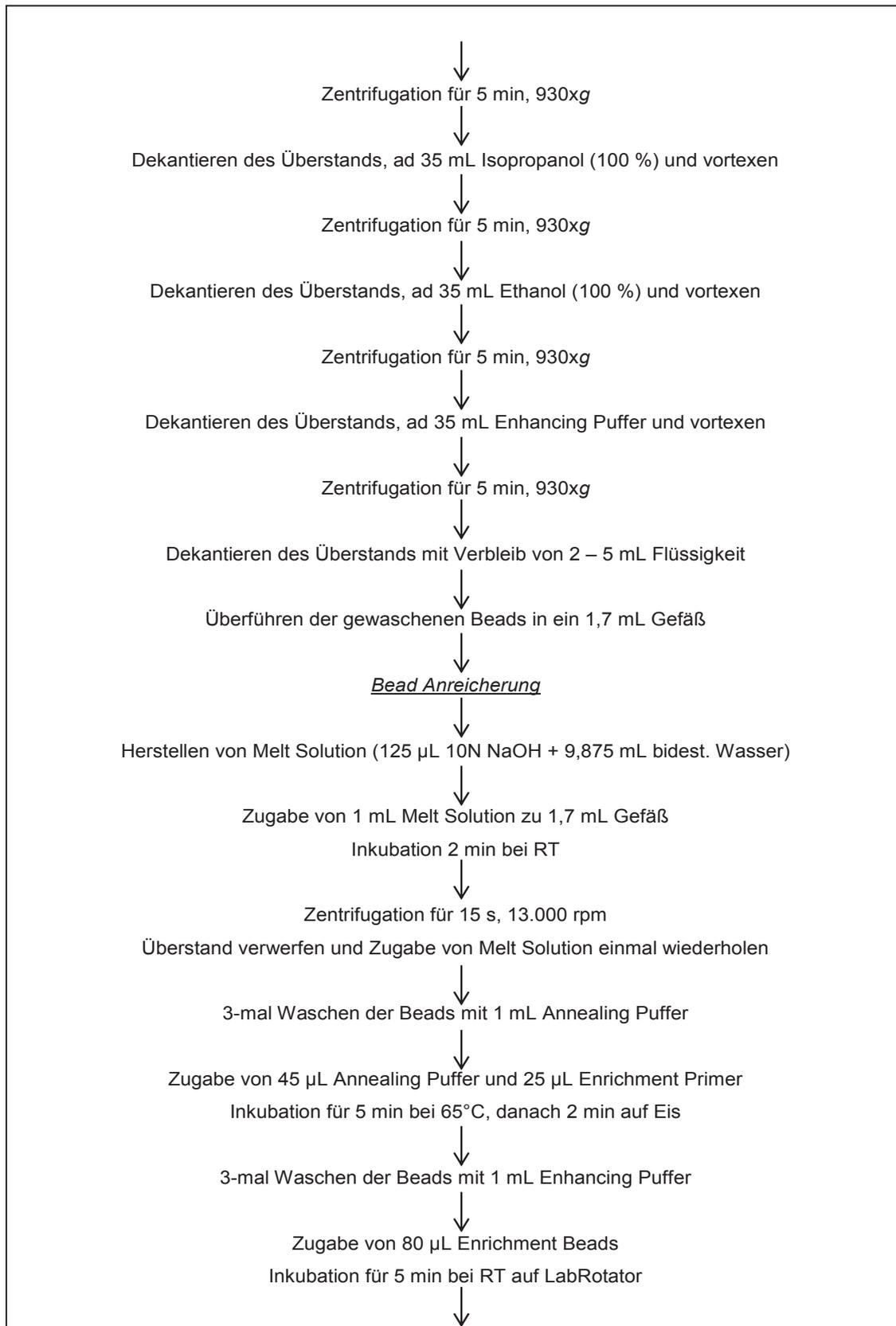
Fortsetzung Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplification und Sequencing



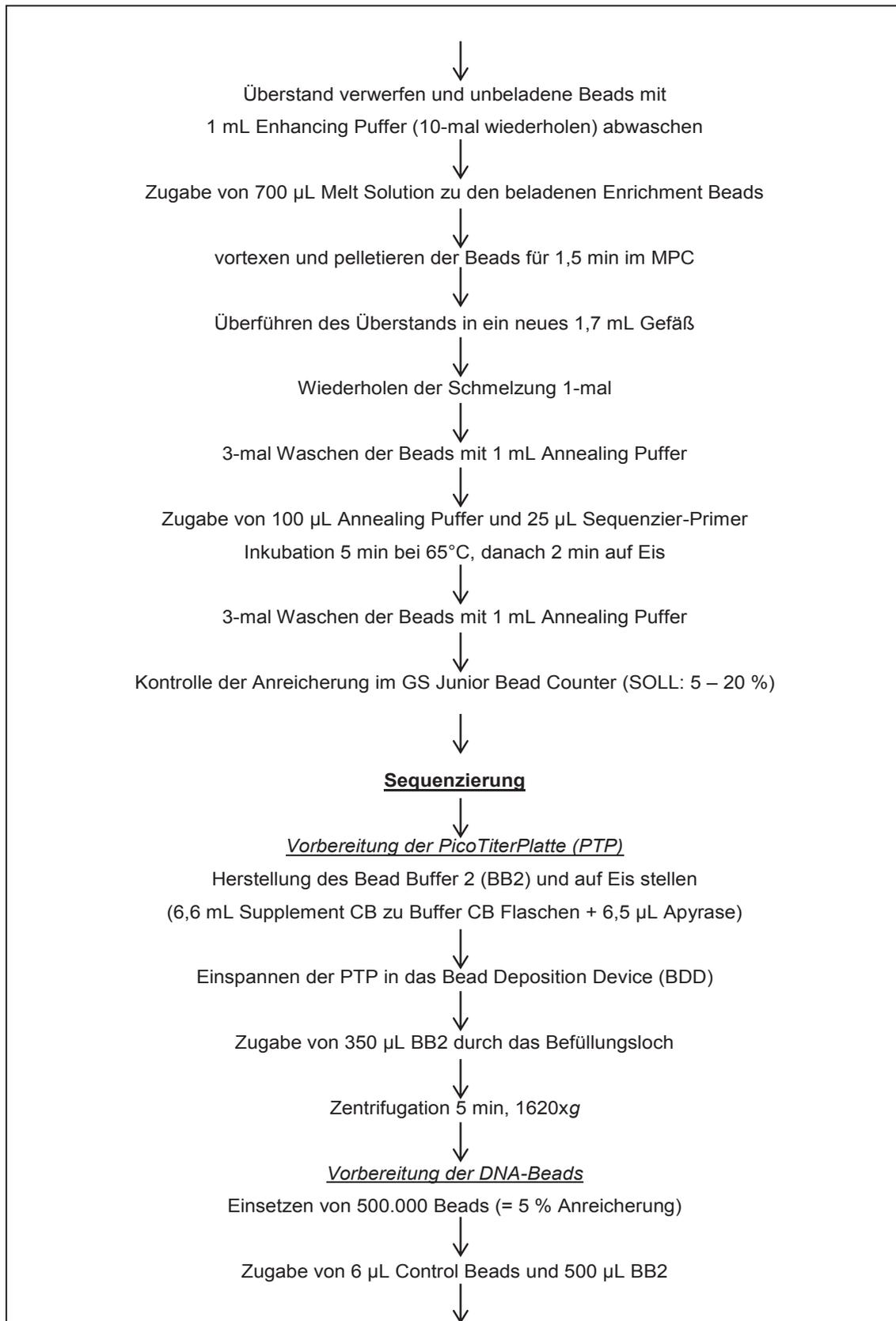
Fortsetzung Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplifikation und Sequencing



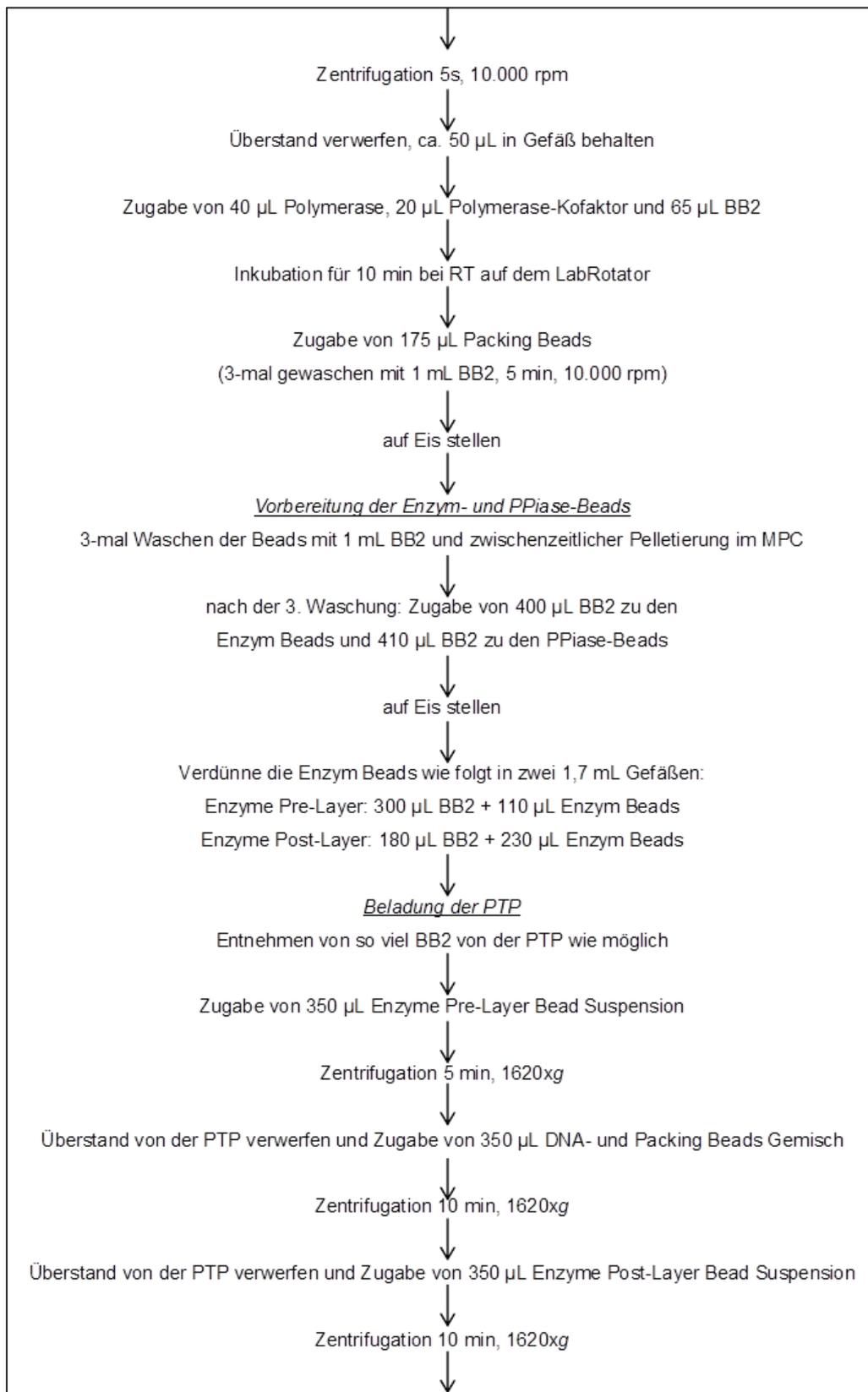
Fortsetzung Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplifikation und Sequencing



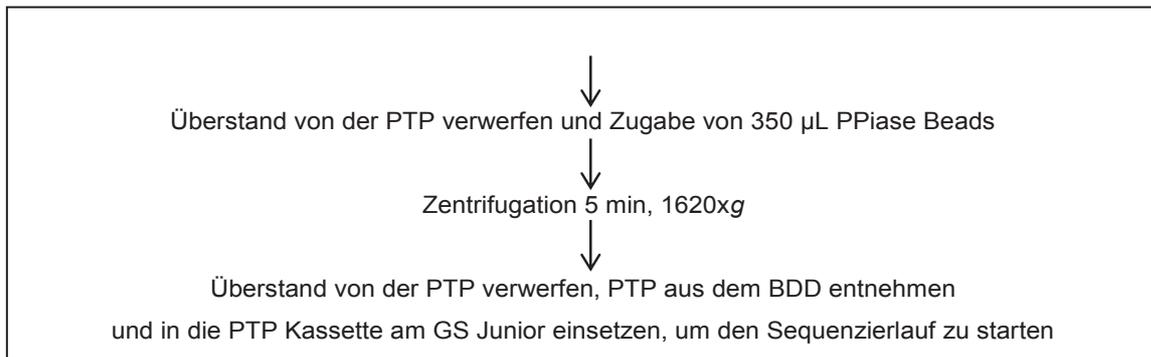
Fortsetzung Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplification und Sequencing



Fortsetzung Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplification und Sequencing



Fortsetzung Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplification und Sequencing



Fortsetzung Abbildung 29: Ablauf der Probenvorbereitung bei GS Junior 454 Sequencing (ROCHE) gemäß den Herstelleranleitungen (gekürzt) für Short Fragment Removal, Amplicon Library Preparation, emPCR Amplification und Sequencing

10.2.4 Anhang B4: Detektion von amplifizierter DNA mittels Agarosegelelektrophorese

10.2.4.1 Amplifikation von Pilzreinkulturen mit universellen Pilz-Primerpaaren

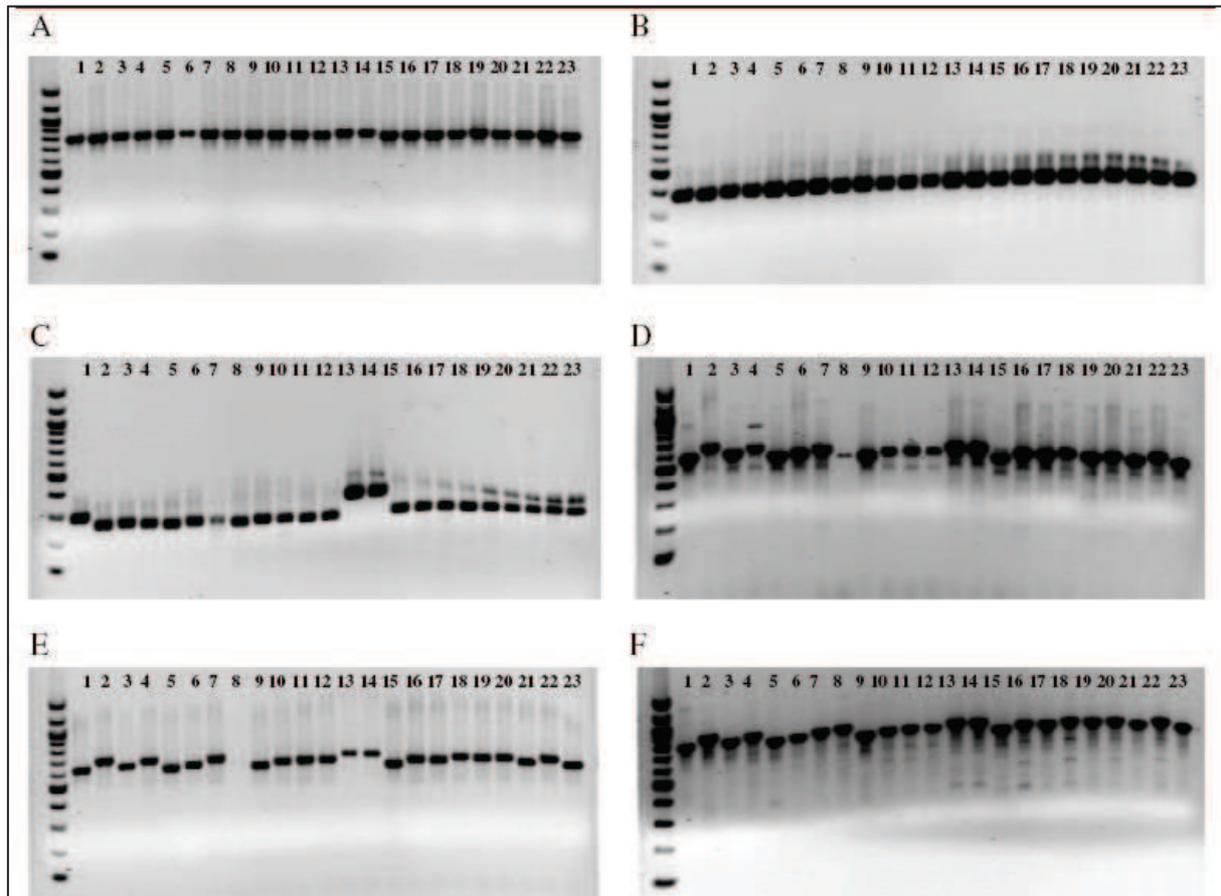


Abbildung 30: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation von Pilzreinkulturen aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Tierhygiene mit den Primerpaaren (A) 0817/1536, (B) NS7/NS8, (C) U1/U2, (D) ITS1/ITS4, (E) ITS1F/ITS4 und (F) Fun18sf/ITS4

Auftragsreihenfolge:

1: *Wallemia* sp.; 2: *Trichoderma* sp.; 3: *Aureobasidium pullulans*; 4: *Trichothecium roseum*; 5: *Cladosporium* sp.; 6: *Alternaria* sp.; 7: *Moniliella* sp.; 8: *Chrysonilia* sp.; 9: *Epicoccum* sp.; 10: *Chaetomium* sp.; 11: *Stachybotrys chartarum*; 12: *Stachybotrys chartarum*; 13: *Rhizopus peca*; 14: *Mucor spinosus*; 15: *Fusarium* sp.; 16: *Penicillium chrysogenum*; 17: *P. brevicompactum*; 18: *Aspergillus clavatus*; 19: *A. flavus*; 20: *A. fumigatus*; 21: *A. versicolor*; 22: *A. niger*; 23: *A. glaucus* Group

10.2.4.2 Nachweis pflanzlicher DNA nach Amplifikation von Total-DNA-Extrakten aus Matratzenstaub mit Primerpaar ITS1/ITS4

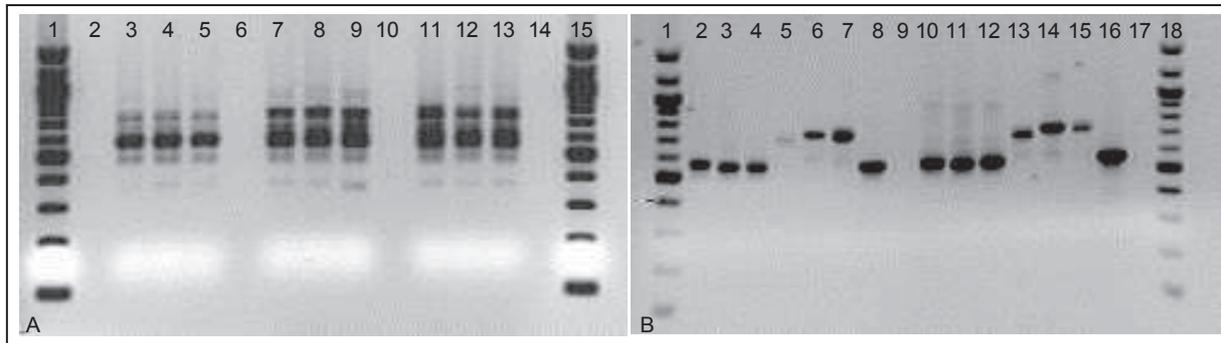


Abbildung 31: Agarosegelelektrophorese nach Amplifikation von (A) Total-DNA-Extrakten aus Matratzenstaubproben mit Power Soil™ DNA Isolation Kit (MOBIO) und (B) vorselektierten DNA-Proben nach Gelextraktion mit Primerpaar ITS1/ITS4

A: Dreifach-Amplifikation von drei Matratzenstaub-DNA-Extrakten; 1: DNA-Leiter; 2: leer; 3-5: Staub 1; 6: leer; 7-9: Staub 2; 10: leer; 11-13: Staub 3; 14: leer; 15: DNA-Leiter

B: Re-Amplifikation des 570-590 und 750 bp Fragments der Matratzenstaubproben 1-3 (A) im Doppelansatz mit anschließender Sanger-Sequenzierung von Probe 6 (*Cucumis sativus*) und 7 (Teilsequenzen von *Trebouxia decolorans* und *Nicotiana tabacum*); 1: DNA-Leiter; 2-4: 570-590 bp Fragment von Staubprobe 1-3; 5-7: 750 bp Fragment von Staubprobe 1-3; 8: Positivkontrolle (Reinkultur); 9: Negativkontrolle; 10-12: 570-590 bp Fragment von Staubprobe 1-3; 13-15: 750 bp Fragment von Staubprobe 1-3; 16: Positivkontrolle (Reinkultur); 17: Negativkontrolle; 18: DNA-Leiter

10.2.4.3 Amplifikation von Proben der PCR-SSCP-Gelposition 621/627 mit speziesspezifischen Primern für *Penicillium chrysogenum*, *P. commune*/*camembertii*/*echinulatum*/*crustosum*/*solitum*, *Exophiala dermatitidis* und *E. jeanselmei*

10.2.4.3.1 Amplifikation mit Primerpaar PchryF4-1/PchryR8 (*P. chrysogenum*)

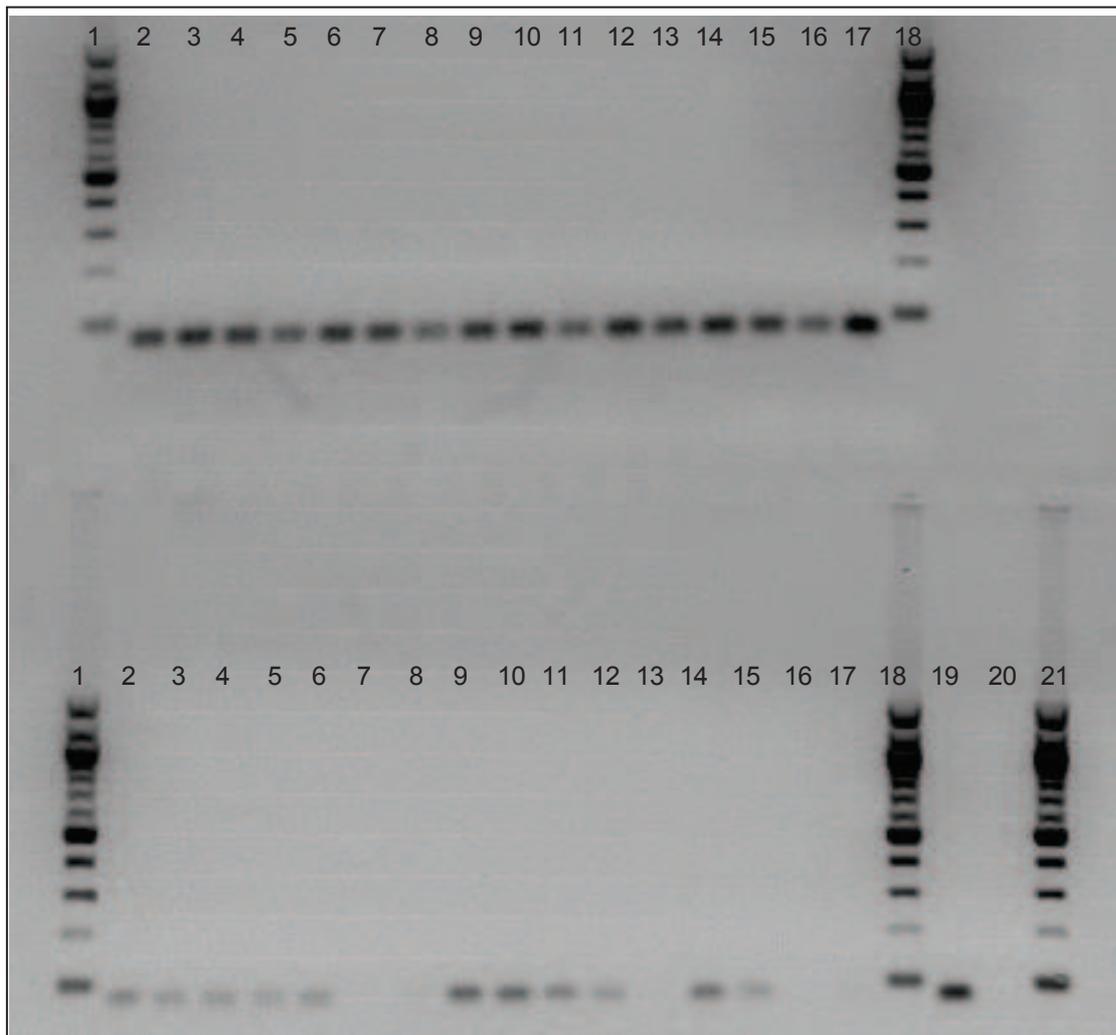


Abbildung 32: Amplifikation des vorselektierten 570-590 bp Fragments (oben) und der Crush & Soak-Proben (unten) von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar PchryF4-1/PchryR8

Auftragsreihenfolge (für Probenindex s. Tabelle 31):

1: DNA-Leiter; 2: Probe 1; 3: Probe 2; 4: Probe 3; 5: Probe 4; 6: Probe 5; 7: Probe 6; 8: Probe 7; 9: Probe 8; 10: Probe 9; 11: Probe 10; 12: Probe 11; 13: Probe 12; 14: Probe 13; 15: Probe 14; 16: Probe 15; 17: Probe 16; 18: DNA-Leiter; 19: Reinkultur von *P. chrysogenum* (DSM 844); 20: Negativkontrolle; 21: DNA-Leiter

10.2.4.3.2 Amplifikation mit Primerpaar PchrF1/PauraR1 (*P. commune/camembertii/echinulatum/crustosum/solitum*)

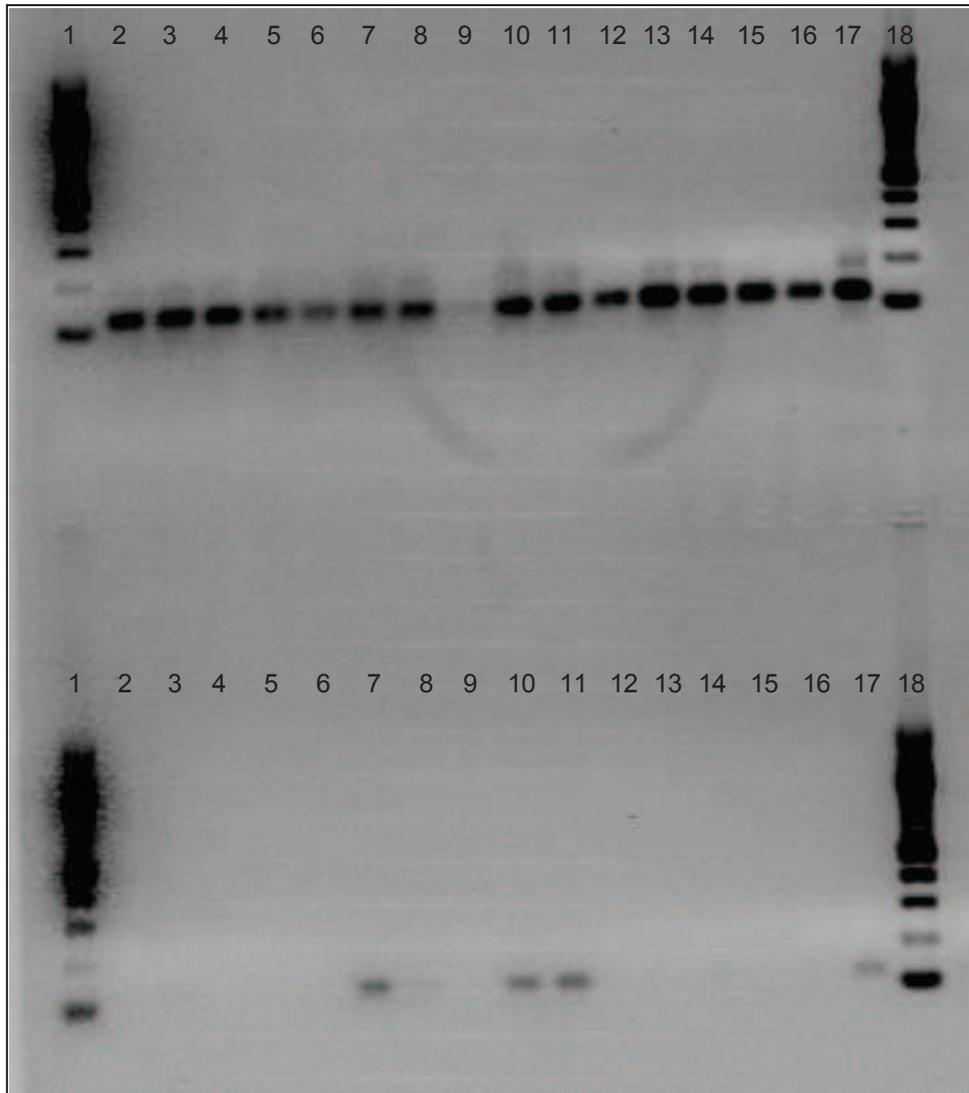


Abbildung 33: Amplifikation des vorselektierten 570-590 bp Fragments (oben) und der Crush & Soak-Proben (unten) von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar PchryF1/PauraR1

Auftragsreihenfolge (für Probenindex s. Tabelle 31):

1: DNA-Leiter; 2: Probe 1; 3: Probe 2; 4: Probe 3; 5: Probe 4; 6: Probe 5; 7: Probe 6; 8: Probe 7; 9: Probe 8; 10: Probe 9; 11: Probe 10; 12: Probe 11; 13: Probe 12; 14: Probe 13; 15: Probe 14; 16: Probe 15; 17: Probe 16; 18: DNA-Leiter

10.2.4.3.3 Amplifikation mit Primerpaar ExdF/ExdR (*Exophiala dermatitidis*)



Abbildung 34: Amplifikation der Crush & Soak-Proben von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar ExdF/ExdR

Auftragsreihenfolge (für Probenindex s. Tabelle 31):

1: DNA-Leiter; 2: Probe 1; 3: Probe 2; 4: Probe 3; 5: Probe 4; 6: Probe 5; 7: Probe 6; 8: Probe 7; 9: Probe 8; 10: Probe 9; 11: Probe 10; 12: Probe 11; 13: Probe 12; 14: Probe 13; 15: Probe 14; 16: Probe 15; 17: Probe 16; 18: Negativkontrolle; 19: DNA-Leiter

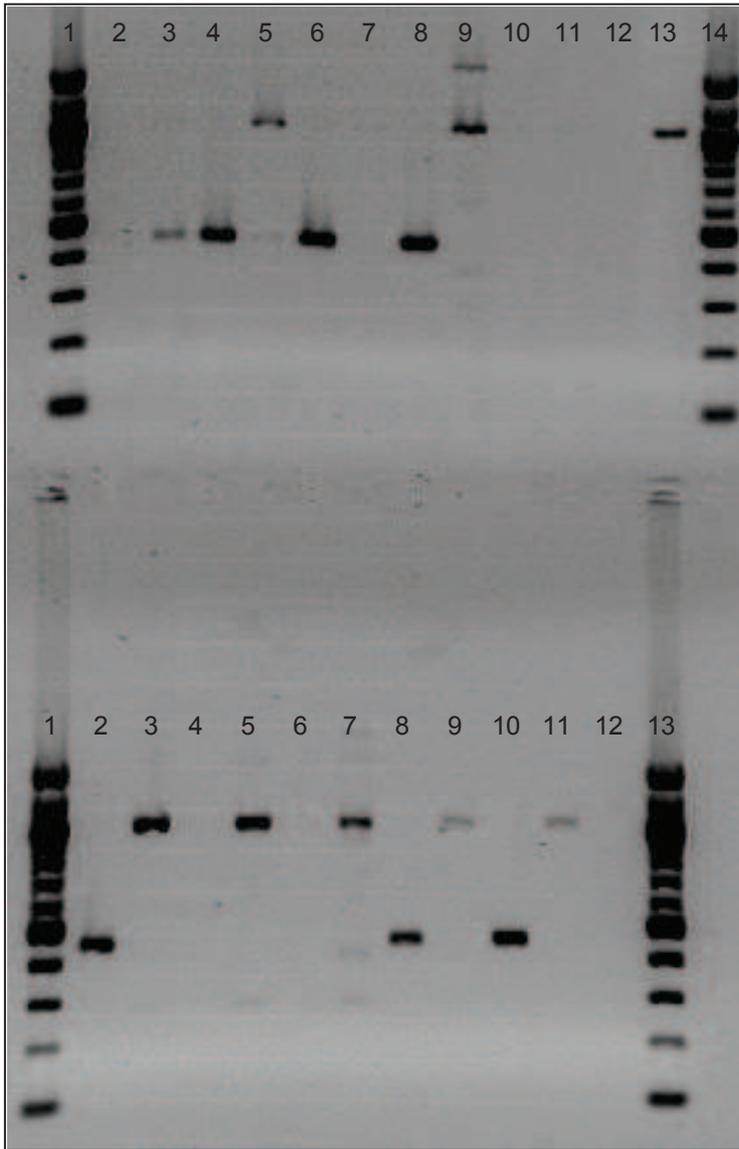


Abbildung 35: Amplifikation des vorselektierten 570-590 bp Fragments (a) und des nativen DNA-Extrakts (b) von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar ExdF/ExdR

Auftragsreihenfolge (für Probenindex s. Tabelle 31):

oben: 1: DNA-Leiter; 2: Probe 1a; 3: Probe 1b; 4: Probe 2a; 5: Probe 2b; 6: Probe 3a; 7: Probe 3b; 8: Probe 4a; 9: Probe 4b; 10: Probe 5a; 11: Probe 5b; 12: Probe 6a; 13: Probe 6b; 14: DNA-Leiter

unten: 1: DNA-Leiter; 2: Probe 7a; 3: Probe 7b; 4: Probe 11a; 5: Probe 11b; 6: Probe 12a; 7: Probe 12b; 8: Probe 15a; 9: Probe 15b; 10: Probe 16a; 11: Probe 16b; 12: Negativkontrolle; 13: DNA-Leiter

10.2.4.3.4 Amplifikation mit Primerpaar E1m/E2 (*Exophiala jeanselmei*)

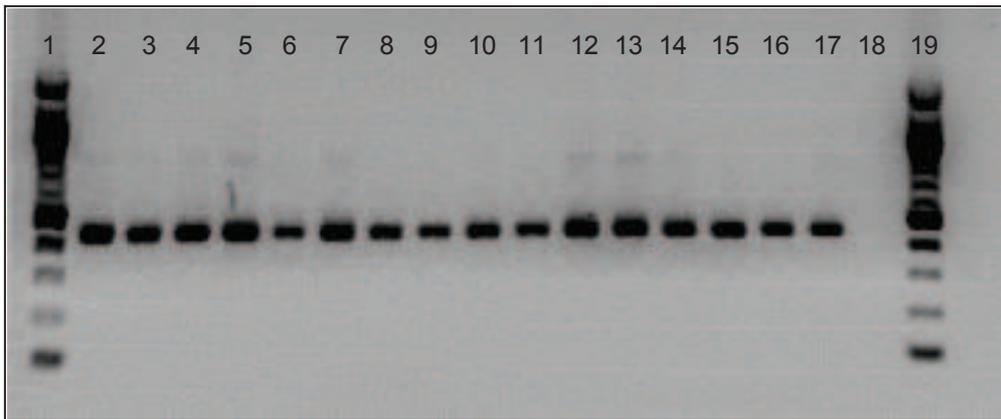


Abbildung 36: Amplifikation des nativen DNA-Extrakts von Proben der Gelposition 621/627 mit Primerpaar E1m/E2

Auftragsreihenfolge (für Probenindex s. Tabelle 31):

1: DNA-Leiter; 2: Probe 1; 3: Probe 2; 4: Probe 3; 5: Probe 4; 6: Probe 5; 7: Probe 6; 8: Probe 7; 9: Probe 8; 10: Probe 9; 11: Probe 10; 12: Probe 11; 13: Probe 12; 14: Probe 13; 15: Probe 14; 16: Probe 15; 17: Probe 16; 18: Negativkontrolle; 19: DNA-Leiter

11 Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater und Mentor, Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. Johann Bauer, vielmals danken. Das Angebot zur Durchführung dieser Doktorarbeit mit einem äußerst spannenden Thema und unter Verwendung und Etablierung der modernsten Verfahren hat mich sehr gefreut. Vielen Dank auch für das in mich gesetzte Vertrauen und die stets vorhandene Rückendeckung bei methodischen, aber vor allem auch bei persönlichen Rückschlägen. Ich wünsche ihm für seine Ruhestandszeit alles erdenklich Gute.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Dr. h.c. Erika von Mutius ebenfalls für die spannende Thematik meiner Dissertation sowie des Weiteren für die Einführung in den Hintergrund epidemiologischer Studien, für viele beratende Treffen und die Übernahme der Tätigkeit als Zweitprüferin meiner Arbeit.

Prof. Dr. Siegfried Scherer danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Vielmals bedanken möchte ich mich bei Dr. Markus Ege für die zahlreichen Besprechungen, Telefonate und Hilfestellungen im Zuge der statistischen, epidemiologischen Auswertung der PCR-SSCP- und Pyrosequenzierdaten sowie für die Korrektur von Manuskripten.

Großer Dank gebührt meinen Betreuerinnen Dr. Melanie Mayer, für die Vorarbeiten im Zuge ihrer Dissertation und der Einweisung in die Thematik, und vor allem PD Dr. Karin Schwaiger für die kurzfristige, aber unkomplizierte und stets freundliche Übernahme der Betreuung. Vielen Dank für die immer vorhandene Verfügbarkeit bei Fragen, Problemen und Manuskriptkorrekturen.

Dr. Antje Legatzki bin ich für die statistische Auswertung der Sequenzdaten aus der Pyrosequenzierung sehr dankbar.

Ich bedanke mich bei dem SFB/TR22 und der DFG für die Finanzierung dieses Projekts und bei der TUM Graduate School, Graduiertenzentrum Weihenstephan, für die Möglichkeit des Besuchs fortbildender Seminare.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierhygiene recht herzlich für die nette Aufnahme, die schöne, gemeinsame Zeit und die tolle Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Samart Dorn-In für die vielen methodischen

Diskussionen und die gemeinsame Zeit im Büro, bei Annika Bartuschat, Thomas Korbica, Andrea Klaus und Sonja Kattner für die grandiose Unterstützung bei der Probenabarbeitung, sowie bei Barbara Fritz und Cornelia Oehme für die Einweisung in die Methodiken und für die Beantwortung von Fragen erkenntlich zeigen. Frau de Carné und Frau Laubmeier danke ich für Hilfestellungen bei sämtlichen Verwaltungsangelegenheiten.

Zudem möchte ich Beatrix Bialek von der Universität Duisburg-Essen für die Herstellung von Kämmen und Spacern für die PCR-SSCP-Apparatur sowie den Mitarbeitern der Bauernhöfe Veitshof, Hirschau, Grünschwaige, LfL Grub und LfL Achsel-schwang für die Unterstützung bei der Staubsammlung meinen Dank aussprechen.

Allen Freunden und Bekannten, die mir für meine Methodenentwicklung Matratzenstaub zur Verfügung gestellt haben, bin ich hierfür ebenfalls sehr dankbar.

Ich danke Camilla Usselmann dafür, dass sie die letzten 3 Jahre zu mir gestanden hat, mich aufgebaut und mir Mut zugesprochen hat, wenn ich auch mal methodisch oder persönlich zurückgeworfen wurde.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Mutter die mich zeitlebens, aufopferungsvoll bei meinem Werdegang unterstützt hat und leider den Abschluss meiner Doktorarbeit nicht mehr miterleben kann, meinen unbeschreiblichen Dank bekunden. Ich weiß, du wärst sehr stolz auf mich gewesen.

12 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt (promotionsführende Einrichtung) der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Molekularbiologische Untersuchungen zur Pilzdiversität in Stall- und Hausstaubproben mittels PCR-SSCP und Parallelsequenzierung“

am

Lehrstuhl für Tierhygiene der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

unter der Anleitung und Betreuung durch: Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. Johann Bauer

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

- Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
- Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.
- Die vollständige Dissertation wurde in _____ veröffentlicht. Die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt (promotionsführende Einrichtung) hat der Veröffentlichung zugestimmt.
- Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.
- Ich habe bereits am _____ bei der Fakultät für _____ der Hochschule _____ unter Vorlage einer Dissertation mit dem Thema _____ die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis: _____

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die

Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich einverstanden.

(Ort, Datum, Unterschrift)

13 Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Tobias Janke
 Ostendorferweg 6, 80686 München
 Tel.: +49 (0)89 88 56 74 48
 E-Mail: tobias-janke@gmx.de

Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Geburtsdatum: 01.09.1983
 Geburtsort: München

BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

- | | |
|---------------------|---|
| Aug 2009 – heute | Doktorarbeit und wissenschaftliche Mitarbeit, SFB/TR22, Lehrstuhl für Tierhygiene, TU München, Freising

<i>„Molekularbiologische Untersuchungen zur Pilzdiversität in Stall- und Matratzenstaubproben mittels PCR-SSCP und Parallelesequenzierung“</i> |
| Feb 2009 – Jul 2009 | Diplomarbeit, Mikrogen GmbH, Neuried

<i>„Expressionsklonierung, Reinigung und serologische Charakterisierung von Antigenen des Varizella-Zoster-Virus“</i> |
| Okt 2007 – Dez 2007 | Praktikum, Lehrstuhl für Physiologie, TU München

<i>„Investigation of the existence of recombinant DNA (cry1Ab) in milk from cows fed genetically modified maize (MON810)“</i> |

AUSBILDUNG UND QUALIFIKATIONEN

- | | |
|---------------------|--|
| Sep 2011 | Teilnahme am Grundlagenseminar <i>„GMP in der biopharmazeutischen Industrie“</i> , Concept Heidelberg GmbH, Stuttgart |
| Mai 2010 – Jul 2010 | Teilnahme an den Seminaren <i>„Ökonomisches Denken“</i> und <i>„Internationales Projektmanagement“</i> , TUM Graduate School |
| Apr 2009 – Sep 2009 | Weiterbildung zum <i>„Experten für Schlüsselkompetenzen“</i> , Gayk Personalmarketing GmbH |
| Okt 2004 – Jul 2009 | Studium der Biologie (Diplom), TU München, Freising |
| Sep 2003 – Jun 2004 | Zivildienst beim BRK, Behindertenfahrdienst, Starnberg |
| Sep 1994 – Mai 2003 | Otto-von-Taube-Gymnasium, Gauting |
| Sep 1990 – Jul 1994 | Josef-Dosch-Grundschule, Gauting |
-

 METHODISCHE FÄHIGKEITEN

Doktorarbeit	Mikrobielle Anzucht und Bestimmung, DNA-Extraktion, PCR, PCR-SSCP, qPCR, 454 Pyrosequenzierung (GS Junior, Roche)
Diplomarbeit	Mikrobielle Fermentation, DNA-Extraktion, PCR, Klonierung, Proteinaufreinigung (Ionenaustausch-/Affinitäts-Chromatographie), Western Blot, Line Assay, Arbeit nach DIN EN ISO 13485
Studium	PCR, qPCR, HPLC

 FÜHRUNGSQUALITÄTEN

Mär 2008 – heute	Aktives Mitglied der biotechnologischen Studenteninitiative (btS) e.V.
Aug 2008 – heute	Finanzvorstand, Geschäftsstelle München
Nov 2009 – Nov 2011	Mitglied des Bundesvorstands (Finanzen)
Jul 2008 – Nov 2011	Workshop-Leiter und Projektleiter (u.a. KAM ScieCon München 2009, Konsolidierung der Vereinsstruktur, Finanzstrategie)
Mai 2009 – Mai 2011	Abteilungsleiter und Mannschaftsführer Tischtennis, TSV Pentenried e.V.

 PERSÖNLICHE FÄHIGKEITEN UND INTERESSEN

Sprachkenntnisse	<p>Englisch: fließend in Wort und Schrift Spanisch und Französisch: Grundkenntnisse</p> <p>Teilnahme an den Sprachkursen „<i>Spanish – Language and Communication 2</i>“ und „<i>English in Science and Technology</i>“, TU München</p> <p>Teilnahme am Frankreich-Austausch und English Venture Study Programme, Otto-von-Taube-Gymnasium, Gauting</p>
IT-Kenntnisse	MS-Office (Word, Excel, Power Point): sehr gut GelCompar II, Typo 3: gut
Persönliche Interessen	(Städte-) Reisen, Sport (Tischtennis, Fitness, Fußball, Skifahren), Politik, Lesen, Musik

 PUBLIKATIONEN

Janke T et al. (2013) Analysis of the fungal flora in environmental dust samples by PCR-SSCP method. *Current Microbiology*. DOI: 10.1007/s00284-013-0344-3.

Dorn-In S et al. (2013) PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products. *International Journal of Food Microbiology* 162: 71-81.

Vizoso Pinto MG et al. (2010) A systemic approach for the identification of novel, serologically reactive recombinant Varizella-Zoster Virus (VZV) antigens. *Virology Journal* 7: 165.

München, den
 Ort, Datum

 Unterschrift
