

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

**Einfluss von beruflicher *Aspergillus fumigatus*-
Exposition auf die adaptive Immunantwort via
ELISpot und Western Blot**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Sonja Etter
aus Augsburg

Kaufbeuren, April 2023

Referent: Prof. Dr. Jürgen Löffler

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Störk, Prof. Dr. Matthias Eyrich

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2024

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	1
1.2 Immunantwort auf <i>A. fumigatus</i>	1
1.2.1 Angeborene Abwehrmechanismen gegen <i>A. fumigatus</i>	1
1.2.2 T-Zell-Antwort auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene.....	2
1.2.3 B-Zell-Antwort auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene	5
1.2.4 Einfluss von LPS auf die Immunantwort	7
1.3 Umweltexposition zu <i>A. fumigatus</i>	7
1.4 Allergie	8
1.4.1 Epidemiologie der Allergie	8
1.4.2 Berufsbedingte Allergie	9
1.4.3 Typen der Hypersensitivität	10
1.4.4 B-Zellen und Allergie.....	11
1.5 <i>A. fumigatus</i> - assoziierte Krankheitsbilder	11
1.5.1 Allergische bronchopulmonale Aspergillose	12
1.5.2 Chronische pulmonale Aspergillose.....	13
1.5.3 Invasive Aspergillose	13
1.6 Antigene des <i>A. fumigatus</i>	14
1.7 Kreuzreaktivität des <i>A. fumigatus</i>	21
1.8 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Ethikvotum.....	23
2.2 Materialien	23
2.2.1 Technische Ausrüstung	23
2.2.2 Reagenzien	24
2.3 Methoden	27
2.3.1 Herstellung von Pilzlysaten.....	27
2.3.1.1 Pilzanzucht	27
2.3.1.2 Pilzernte.....	27
2.3.1.3 Hyphenwachstum	27
2.3.1.4 Hyphenlysat.....	28
2.3.2 Protein-Quantifizierung.....	29

2.3.2.1 DC Protein Assay	29
2.3.2.2 Coomassie	29
2.3.3 Analyse von T-Zellen im Rahmen der <i>A. fumigatus</i> -Immunantwort.....	30
2.3.3.1 Studienpopulation.....	30
2.3.3.2 Blutentnahme	31
2.3.3.3 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)	31
2.3.3.4 ELISpot	33
2.3.4 Analyse von B-Zellen im Rahmen der <i>A. fumigatus</i> -Immunantwort.....	35
2.3.4.1 Gewinnung von autologem Serum aus Spenderblut	35
2.3.4.2 Western Blot.....	35
2.3.4.3 IgE-Immuno-CAP-Test.....	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Methodik zur Gewinnung von <i>Ascomycota</i> -Lysaten.....	38
3.1.1 Konidienanzucht auf Bierwürz-Agarplatten	38
3.1.2 Proteinkonzentration der Lysate.....	38
3.1.3 Etablierung eines Protokolls für die Herstellung des <i>C. herbarum</i> - Hyphenlysats	41
3.2 Konzentration und Reinheit der spezifischen Antigene und Lysate.....	42
3.2.1 Proteinkonzentration der Antigene und Lysate.....	42
3.2.2 Konzentration und Reinheit der <i>A. fumigatus</i> -Antigene im SDS-PAGE Coomassie	43
3.3 PBMC-basierter ELISpot zur T-Zell-Analyse mithilfe der hergestellten Lysate und spezifischer <i>A. fumigatus</i> -Antigene	44
3.3.1 Einfluss der frühzeitigen Vorbereitung der ELISpot-Platten auf die Messergebnisse.....	44
3.3.2 Grenzwerte der LPS-Konzentrationen von Antigenen und Lysaten.....	46
3.3.3 Vergleich der T-Zellantwort zwischen beruflich Schimmelpilz-Exponierten und der Kontrollgruppe	49
3.3.3.1 IFN- γ -Antwort auf spezifische <i>A. fumigatus</i> -Antigene und Lysat	51
3.3.3.2 IL-5-Antwort auf spezifische <i>A. fumigatus</i> -Antigene und Lysat	53
3.3.3.3 IL-17A-Antwort auf spezifische <i>A. fumigatus</i> -Antigene und Lysat	55
3.3.3.4 Expositionsabhängiger Vergleich des <i>A. fumigatus</i> - spezifischen IL5-/ IFN- γ -Verhältnisses	56
3.3.3.5 Expositionsabhängiger Vergleich des <i>A. fumigatus</i> -spezifischen IL17A-/ IFN- γ -Quotienten	58

3.4 B-Zell-Antwort auf <i>A. fumigatus</i>	58
3.4.1 Etablierung des Western Blot-Protokolls.....	59
3.4.2 Expositionsabhängiger Vergleich der IgE-AK-Profile im Western Blot.....	62
3.4.3 Expositionsabhängiger Vergleich der IgE-AK-Profile im ImmunoCAP-Test	64
3.4.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse von Western Blot und ImmunoCAP-Test	65
4. Diskussion	66
4.1 Methodik zur Gewinnung von <i>Ascomycota</i> -Lysaten.....	66
4.2 PBMC-basierter ELISpot zur Detektion expositionsabhängiger Unterschiede der T-Zell-Immunantwort auf spezifische <i>A. fumigatus</i> -Antigene	68
4.2.1 Messabweichung bei frühzeitiger Vorbereitung der ELISpot-Platten	68
4.2.2 LPS-induzierte unspezifische Stimulation von T-Zellen	68
4.2.3 <i>A. fumigatus</i> -spezifische TH1-Antwort bei Biolandwirten/-innen erhöht	69
4.2.4 <i>A. fumigatus</i> -spezifische TH2-Antwort bei Biolandwirten/-innen erhöht	71
4.2.5 TH17-Antwort ohne wesentliche expositionsabhängige Unterschiede	72
4.2.6 Expositionsabhängiger Vergleich von TH2 zu TH1 im allergischen Kontext	72
4.2.7 Expositionsabhängiger Vergleich von TH17 zu TH1 im allergischen Kontext	73
4.2.8 Auswirkungen des Alters auf die Immunantwort	74
4.2.9 Einfluss der Jahreszeit auf die <i>A. fumigatus</i> -spezifische Immunantwort.....	75
4.2.10 Stärken und Schwächen der ELISpot-Analyse	75
4.3 Detektion <i>A. fumigatus</i> -spezifischer IgE-Antikörper	77
4.4 Umweltmedizinische Anwendungsmöglichkeit der B- und T-Zell-Assays	79
5. Zusammenfassung	80
6. Literaturverzeichnis	83
Appendix	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis	
III Tabellenverzeichnis	
Anhang: Western Blot - Imaging	
IV Danksagung	
V Lebenslauf	
VI Eigene Veröffentlichungen	

1. Einleitung

1.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) zählt zu den saprotrophytischen Pilzen. Er zersetzt organische Materialien in Kohlenstoff und Stickstoff und spielt damit eine wichtige Rolle im Ernährungskreislauf. Deshalb und weil er sehr thermo- und pH-stabil ist, findet man ihn in vielen ökologischen Nischen. Dazu gehören Luft, Erdboden und Kompost, aber auch Blumenerde von Zimmerpflanzen und schimmelige Lebensmittel können von ihm besiedelt werden [3-5].

Sein Name hat lateinischen Ursprung und beschreibt im Prinzip sein Aussehen: „Aspergere“ heißt zu Deutsch „bespritzen“ und bezieht sich auf die Form des Pilzes [6]. „Fumus“ spielt auf seine rauchgrüne Farbe an, die Folge des 1,8-Dihydroxynaphthalin-Melanins ist [7]. Im Volksmund wird er häufig auch „Gießkannenschimmel“ genannt.

Mittels umweltresistenter Sporen, den sogenannten Konidien, kann sich *A. fumigatus* vermehren. Ist genügend Ernährung vorhanden, keimen diese zu Hyphen aus. Das Geflecht aus vielen Hyphenschläuchen, das Myzel, bildet an seiner Oberfläche Konidiophoren. Das sind Vesikel, die mit Sporen gefüllt sind und darauf warten, freigesetzt zu werden [3, 4].

1.2 Immunantwort auf *A. fumigatus*

Verteilt werden die Konidien durch Wind oder sonstige Unruhe im System, beispielsweise beim Umgraben des Komposts. Der Pilz selbst ist dazu nicht in der Lage. Aufgrund der geringen Größe (2-3 μ m) und des niedrigen Gewichts, bleiben die Sporen einerseits in der Luft und können andererseits beim Einatmen bis in die Lungenalveolen vordringen. Täglich atmen wir Menschen etwa 100-1000 Konidien ein [5].

1.2.1 Angeborene Abwehrmechanismen gegen *A. fumigatus*

Überwiegend sorgt die mukoziliäre *Clearance* (zu Deutsch: Reinigung) dafür, dass sich die Konidien gar nicht erst festsetzen können, sondern sofort Richtung Oropharynx abtransportiert werden. Erreichen die Sporen dennoch die Alveolen, versuchen Typ-II-Pneumozyten, Alveolarmakrophagen und Neutrophile die Sporen zu phagozytieren. Sind diese Systeme allerdings defekt oder im Verhältnis zur Erregermenge zu schwach, kann der Schimmelpilz in der Lunge persistieren und zu Hyphen auskeimen [8, 9]. Im Gegensatz zu Konidien können diese nicht phagozytiert werden, da sie zu groß sind [3, 10].

Beim Auskeimen verlieren die Konidien ihren Hydrophobin-Mantel und das schützende Melanin-Biopigment [3, 7], sodass die darunter liegenden Zellwandpolysaccharide β -1,3-Glucan und Galactomannan freigelegt werden [11]. Das angeborene Immunsystem erkennt sie als PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) und bindet sie an die PRRs (*pathogen recognition receptors*) Dectin-1 bzw. Dectin-2 [3]. Auch Proteine, die die auskeimenden Hyphen zur Umgebungsanpassung sezernieren [12], werden von spezifischen PRRs detektiert. Dazu zählen Pentraxin3 [13], ein für dendritische Zellen spezifischer ICAM3-grabbing non-integrin (kurz DC-SIGN) [14] und verschiedene NOD (Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne)-like-Rezeptoren.

Durch die Bindung von pathogenen Bestandteilen an die erkennenden Rezeptoren werden Makrophagen und DZ (dendritische Zellen) stimuliert. Sie sezernieren inflammatorische Zytokine, die weitere Immunzellen anlocken und prozessieren die Antigene, um sie den T-Zellen zu präsentieren [3, 11, 15].

An dieser Stelle der Wirtsabwehr wird die erworbene Immunantwort involviert. Naive T_H-Zellen (T-Helferzellen) werden durch Antigenpräsentation von pulmonalen dendritischen Zellen zu *Aspergillus*-spezifischen T_H-Zellen geprägt [15].

1.2.2 T-Zell-Antwort auf *A. fumigatus*-Antigene

T-Zellen sind ein wesentlicher Bestandteil der erworbenen Immunität. Sie sorgen für eine zielgerichtete Immunabwehr [15].

Sie binden mit ihrem Rezeptor (TZR) und den Co-Rezeptoren CD4 oder CD8 an MHC- (*major histocompatibility complex*) präsentierte Antigene auf DZ (CD4 bindet an MHC-II-, CD8 ist MHC-I-Klassen restringiert). Zwischen den beiden Zellen bildet sich eine immunologische Synapse. Daraufhin wird eine zweite Bindung über das Glykoprotein B7 der antigenpräsentierenden Zelle und CD28 der T-Zelle aufgebaut. Nach dieser Costimulation ist die T-Zelle aktiviert. Sie proliferiert und differenziert sich [16].

MHC-I wird auf jeder Zelle exprimiert und präsentiert Proteine von Pathogenen, die die Zelle infiziert haben. Naive CD8-T-Zellen differenzieren zu CTLs (zytotoxischen T-Lymphozyten), um infizierte Zellen zu eliminieren. MHC-II dagegen ist APZ-spezifisch und präsentiert Fremdmoleküle, die aus dem Extrazellulärraum aufgenommen und in intrazellulären Vesikeln proteolytisch wurden [17]. Insofern sind für die adaptive T-Zell-Immunreaktion gegen *A. fumigatus* vor allem die MHC-II-restringierten CD4-Zellen wichtig. Persistiert *A. fumigatus* in der Lunge, befinden sich körperfremde Moleküle im Extrazellulärraum. Zudem sezernieren die

auskeimenden Hyphen Proteine, um sich an die Umgebung anzupassen. Diese Fremdmoleküle können von APZs internalisiert und prozessiert werden, um sie anschließend auf MHC-II den naiven T-Zellen zu präsentieren (siehe **Abbildung 1**).

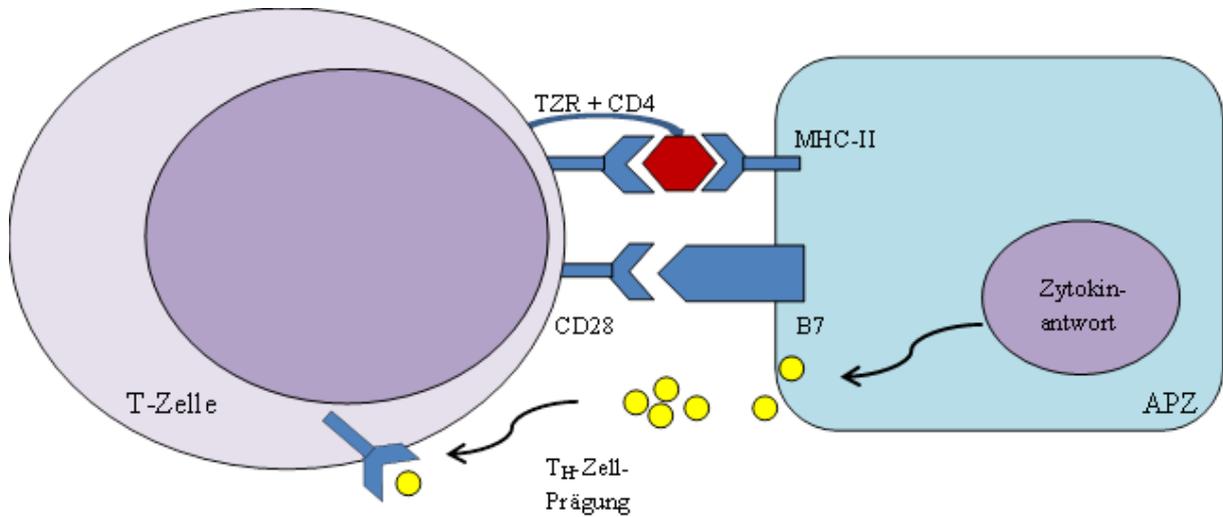


Abbildung 1: Aktivierung naiver T-Zellen zu spezifischen T_H -Zellen durch Antigenpräsentation. APZs präsentieren über MHC-II Aspergillus-Antigene, Erkennung des Antigens über TZR und CD4, Costimulation über Glykoprotein B7 der APZ und CD28 der T-Zelle. T_H -Zellprägung durch Zytokinmilieu diktiert [3].

Naive CD4-T-Zellen differenzieren daraufhin zu sogenannten Helferzellen. Je nach Subtyp haben sie unterschiedliche Auswirkungen auf die Immunantwort, indem sie Toleranz (Typ-1-regulatorische T-Zellen $Tr1$, andere regulatorische T-Zellen T_{reg}) oder eine Immunreaktion (CTL, T_H -Zellen) gegenüber *A. fumigatus* vermitteln [3, 9, 18-20] (siehe **Abbildung 2**).

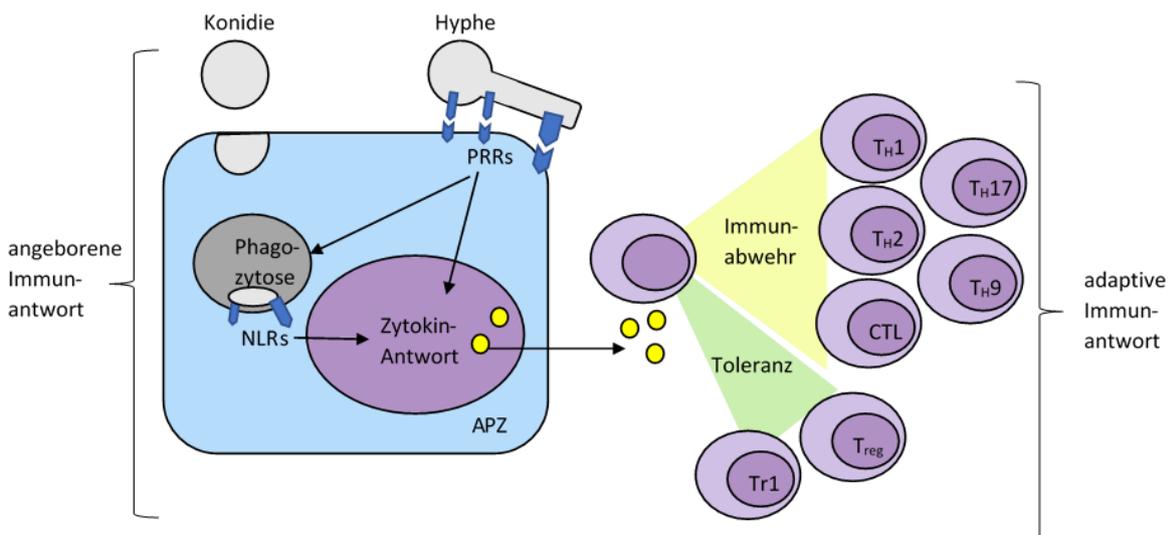


Abbildung 2: *A. fumigatus*-Infektion: angeborene Immunabwehr und T-Zell-Antworten. Gute Erkennung der Hyphen über PRRs, aber schlechte Erkennung der Konidien durch die APZ der angeborenen Immunantwort. Die Zytokinantwort der APZ bei *A. fumigatus*-Kontakt steuert die Differenzierung der T-Zelle zu bestimmten T-Zell-Subtypen, die Toleranz ($Tr1$, T_{reg}) oder eine Immunreaktion (CTL, T_H -Zellen) gegenüber dem Schimmelpilz vermitteln. Damit wird die angeborene mit der adaptiven Immunantwort verknüpft [3].

Zu welchen T_H-Subtypen die naiven T-Zellen differenzieren, hängt von den sezernierten Botenstoffen der DZ und den damit aktivierten Signalwegen und Transkriptionsfaktoren ab. Neben exogenen Faktoren [21] sind individuelle Voraussetzungen mitentscheidend. Heterogenität und angeborene genetische Defekte [22, 23] können Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung nehmen und damit die Immunantwort lenken.

Für die primäre Abwehr von *A. fumigatus* ist der T_H-1-Zelltyp, welcher durch die Zytokine IL-12 und IL-18 geprägt wird [15], bedeutsam. Das Leitzytokin der T_H1-Zellen ist IFN- γ . Gemeinsam mit IL-2, IL-12 und TNF α sorgt es für eine ansteigende antimykotische Aktivität und Nachproduktion angeborener Immunzellen [5, 19].

T_H-17-Zellen werden in der Regel durch Dectin-1-präsentiertes β -Glucan geprägt. Sie sezernieren kennzeichnenderweise IL-17A, IL-17F und IL-22, was zur vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt und Neutrophile aktiviert. Die Neutrophilen limitieren das Pilzwachstum [15, 24].

Die Funktion des T_H-2-Subtyps, dessen Leitzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sind, besteht einerseits in der Eindämmung der T_H1-Antwort und seiner damit antiinflammatorischen Wirkung, zum anderen sorgt der T_H2-Subtyp für die humorale Immunität, da er B-Zellen aktiviert, sie mittels Isotopenswitch prägt (insbesondere zu IgE) und für die Rekrutierung von Eosinophilen sorgt [5, 15, 25].

Um die Immunantwort sinnvoll zu steuern und eine Balance zwischen der T_H1- und T_H2-Immunreaktion herzustellen, sind regulatorische T-Zellen (T_{reg}, Tr1) notwendig. Zunächst soll die Immunantwort angeregt werden, später ist es entscheidend, die Entzündung abklingen zu lassen und Allergien zu vermeiden [3, 15, 26]. In **Abbildung 3** ist das pathogenetische T-Helfer-Populations-Krankheitsauslöser-Modell dargestellt, das beschreibt, dass eine Dominanz einer der beiden T_H-Zellreihen das Immunsystem außer Balance bringt und zu typischen Krankheiten führt. Bei überschießender T_H1-Antwort kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen, im Gegenzug fördert eine zu hohe T_H2-Antwort die Entstehung von Allergien [22]. Bisher in der Literatur eher nebensächlich behandelt sind die T_H17-Zellen, welche bei verlängerter und unkontrollierter Aktivierung zu einer persistierenden Entzündungsreaktion mit Neutrophilen-Infiltraten führen, was die Lunge schädigen und zur Allergieentwicklung beitragen kann [15, 24].

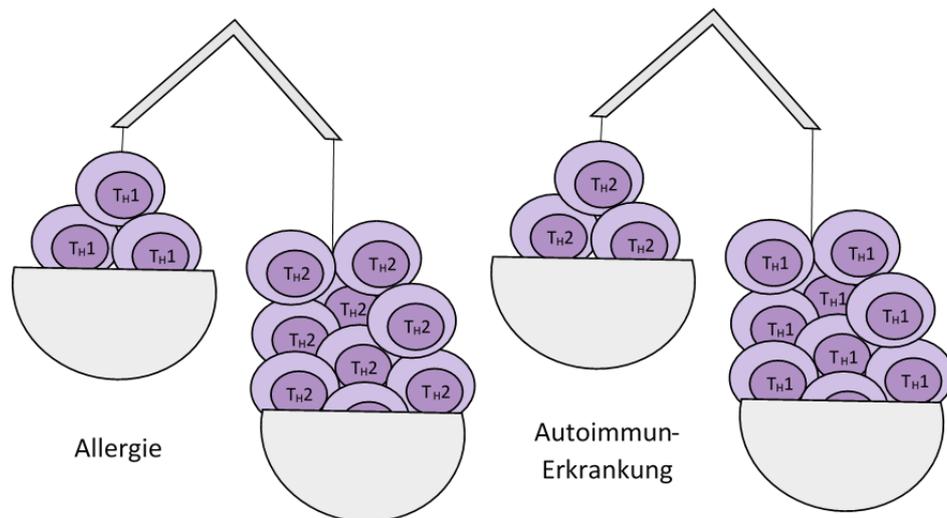


Abbildung 3: Pathogenetisches T-Helfer-Populations-Krankheitsauslöser-Modell [22]. Für eine gesunde Immunabwehr müssen sich die T_H1 - und T_H2 -Zellen die Waage halten. Verlieren die T_H1 - und T_H2 -Immunantwort die Balance, kann es zu allergischen Erkrankungen kommen. Bei überschießender T_H2 -Antwort werden Allergien prädisponiert, bei überschießender T_H1 -Antwort können sich Autoimmun-Erkrankungen entwickeln.

Zu den Faktoren, die eine Dysbalance der T_H -Reaktion begünstigen, gehören u.a. Umweltfaktoren wie eine erhöhte Exposition gegenüber *A. fumigatus*, was in einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Allergien resultiert [21]. Auf diese wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen.

Zwar sind weniger als 1% Antigen-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut zu finden, dennoch gibt ihre Frequenz und die Bestimmung der von ihnen sezernierten Zytokine Aufschluss über die Immunsituation des Individuums. In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung spezifischer T-Zellen der *Enzyme Linked Immuno Spot* (ELISpot) herangezogen, welcher auf der Reaktivität dieser Zellen auf bestimmte Antigene basiert. Nach *in vitro*-Stimulation erfolgt die Beurteilung anhand der Sekretion bestimmter Zytokine [27].

1.2.3 B-Zell-Antwort auf *A. fumigatus*-Antigene

Für die adaptive humorale Immunität sind Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen, die hochaffine AK (Antikörper) sezernieren, um damit das Antigen zu eliminieren, entscheidend. Sowohl Proteine als auch nicht proteinogene Antigene können eine B-Zellreaktion auslösen. Im Gegensatz zu multivalenten Antigenen wie Polysacchariden, benötigen B-Zellen die Hilfe von T_H -Zellen, um Proteinantigene erkennen zu können [28].

Erkennt der B-Zellrezeptor ein spezifisches Epitop auf dem Protein-Antigen, wird zum einen die Genexpression verändert und zum anderen das Antigen internalisiert, in Endosomen zu Peptiden abgebaut und über MHC-II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert [28, 29]. Nach diesem ersten Antigenkontakt wandern die B-Zellen zur T-B-Zell-Grenze der Follikel. Dies

geschieht mittels Chemotaxis: auf B-Zellen sind die oberflächlichen CCR7- und EB12-Rezeptoren hochreguliert, die Chemokine binden können [30].

An der T-B-Zell-Grenze präsentieren die B-Zellen den spezifischen aktivierten T_H -Zellen das Peptid-Antigen. CD40L (auch bekannt als CD154, CD = *cluster of differentiation*) der aktivierten T-Zelle bindet CD40 der B-Zelle, woraufhin die T-Zelle Zytokine sezerniert (siehe **Abbildung 4**). Zusammengenommen sorgen diese Signale für eine B-Zellproliferation und Differenzierung [28, 29].

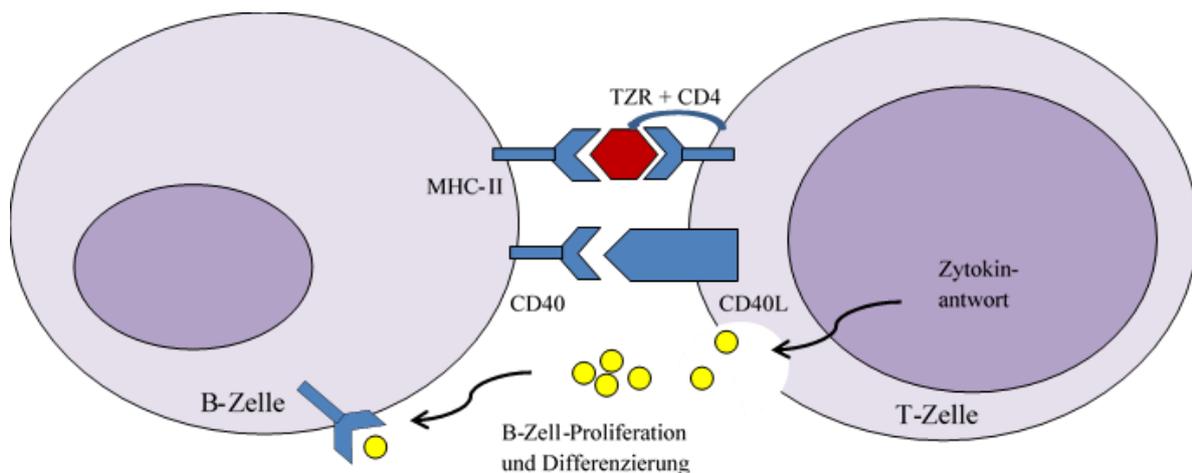


Abbildung 4: T_H -Zell-vermittelte Aktivierung von B-Zellen: B-Zellen präsentieren den T_H -Zellen über MHC-II Aspergillus-Antigene, die spezifische T_H -Zellen über TZR und CD4 erkennen und binden. Als 2. Signal für die B-Zell-Stimulation muss es zur Costimulation über CD40 der B-Zelle und CD40-Ligand der T-Zelle kommen. Zytokinsekretion der T-Zelle unterstützt die B-Zell-Proliferation und Differenzierung [3].

Plasmazellen sind die ausdifferenzierten Effektorzellen der B-Zelllinie, die sekundlich tausende klon-spezifische AK produzieren [31]. Gedächtniszellen ermöglichen eine schnellere und effizientere Immunantwort bei sekundärer Antigenkonfrontation [28, 29].

B-Zellen können einen Klassenwechsel der AK initiieren, was die beachtliche Plastizität der humoralen Immunität erklärt. Jeder Isotyp hat charakteristische Immuneffekte und modulatorische Funktionen im Rahmen der Abwehr [32]. Im Prinzip findet eine somatische Rekombination statt. Dabei bleibt die spezifische Bindungsstelle für das Antigen auf der leichten Kette unverändert, nur der konstante Teil der schweren Kette wird modifiziert [28, 33].

IFN- γ bewirkt IgG3- und IgG2a-Klassenwechsel [29].

T_H2 -Typ-Zytokine, insbesondere IL-4, lenken den Klassenwechsel über IgG1 [34] hin zu IgE-AK [35]. Der IgE-Isotyp führt zur Mastzell- und Eosinophilen-gesteuerten Immunantwort [32]. Normalerweise dient er der Abwehr von Parasiten und Helminthen. Er kann aber unter gewissen Umständen zur Allergie führen [36]. Viele *A. fumigatus*- Moleküle sind potente B-Zell-

Antigene, mehr als 80 Proteine können IgE von sensibilisierten Patienten/-innen binden [37]. Zu einer persistierenden IgE-Immunantwort kommt es nur bei unterschwelligem Antigenstimulus oder fehlenden Warnsignalen an das Abwehrsystem, denn in Keimzentren überlebt der IgE-Isotyp die Selektion nicht. Die klassische atopische Allergie beruht auf IgE-Bildung nach niedriger Exposition zu Allergenen aus der Luft, wie *A. fumigatus*-Sporen. Die persistierende Immunantwort beruht auf langlebigen Plasmazellen [38].

Ob ein Unterschied in der IgE-Antwort auf verschiedene Protein-Antigene des *A. fumigatus* zwischen beruflich Exponierten, Langzeitexponierten und niedrig Exponierten besteht, soll ermittelt werden.

1.2.4 Einfluss von LPS auf die Immunantwort

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen [39]. Über TLR4 (*toll like receptor*) stimulieren sie als PAMPs die proinflammatorische Immunantwort. Auf Zellen der angeborenen Abwehr wie Makrophagen und dendritischen Zellen, die als APZs für T-Zellen dienen, werden costimulatorische Moleküle hochreguliert. Folglich werden T-Zellen vermehrt aktiviert und zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine angeregt. Insbesondere die T_{H1} -Zelldifferenzierung wird durch LPS getriggert, aber auch die Differenzierung anderer T-Zelllinien kann stimuliert werden [40].

Endotoxin-Verunreinigungen können demnach die Messergebnisse verfälschen.

1.3 Umweltexposition zu *A. fumigatus*

In welchen Berufen beziehungsweise in welchem Arbeitsumfeld ist man einer erhöhten Schimmelpilzbelastung ausgesetzt?

Normalerweise liegt die Konzentration von *A. fumigatus* in der Außenluft bei 0,2 bis 15 Sporen pro Kubikmeter (m^3), selten beträgt die Belastung mehr als 500 Konidien pro m^3 [4, 41, 42]. Werte von bis zu 21 Millionen/ m^3 konnten gemessen werden, als schimmeliges Heu aufgeschüttelt wurde. Weitere Quellen für potentiell erhöhte Sporenkonzentrationen sind beispielsweise selbst aufheizende Holzhackschnitzel, Abwasser und Blumenerde [41]. Auch Kompostieren kann große Mengen an Bioaerosolen freisetzen. Bis zu zwei logarithmische Einheiten höhere Konidienbelastungen sind in diesem Zusammenhang möglich. Besonders betroffen sind die Arbeiter/-innen an Ort und Stelle, aber auch Anwohner/-innen in 200 bzw. 500 Metern Entfernung können bei entsprechender Windrichtung und -geschwindigkeit eine

20fach erhöhte Belastung erfahren [43-45]. Andere Berufe, die mit einer erhöhten *Aspergillus*-Exposition einhergehen, sind Arbeiten in der Abfallsortieranlage, Korkindustrie, Kläranlage, auf dem Schlachthof oder in der Geflügel- und Schweinezucht. Die WHO-(Weltgesundheitsorganisations-)Richtlinie von 150 CFU/m³ wird hier häufig übertroffen [46].

Welche Auswirkungen hat die erhöhte Schimmelpilzbelastung auf die Immunantwort?

Im Experiment mit Hasen wurde der Zusammenhang eruiert, dass je häufiger die *A. fumigatus*-Exposition, desto intensiver die Gewebeantwort der Lunge, desto länger besteht eine nachweisbare AK-Antwort [47]. Im Versuch mit Mäusen zeigte die chronische Belastung ein proinflammatorisches Zytokinmuster [48]. 2017 konnten Wurster et al. nachweisen, dass Personen mit hoher Schimmelpilzbelastung im beruflichen oder wohnlichen Umfeld mehr *A. fumigatus*-spezifische T_H - und T-Gedächtniszellen haben. Auch intraindividuelle Anpassungen der T-Zell-Frequenzen im zeitlichen Verlauf abhängig von der momentanen Schimmelpilzexposition wurden festgestellt [42]. Höhere IgG-Antworten wurden bei Bauern/Bäuerinnen, insbesondere bei Nicht-Rauchern/-innen und Vieh-Besitzern/-innen, im Vergleich zu Stadtbewohnern/-innen von Schonheyder et al. verzeichnet [49].

Dass das *A. fumigatus*-Expositionslevel Auswirkungen auf die Immunantwort hat, wurde bereits gezeigt. Welchen Einfluss dies auf die T_H1/T_H2-Balance hat, wie sich die T_H17-Antwort verhält und ob eine wiederholte, hohe Schimmelpilzbelastung die Wahrscheinlichkeit, eine Allergie zu entwickeln, erhöht, wird Bestandteil dieser Studie sein.

1.4 Allergie

1.4.1 Epidemiologie der Allergie

Im 21. Jahrhundert gehören allergische Erkrankungen zu den häufigsten Gesundheitsproblemen [50, 51]. Weltweit leiden mehr als 300 Millionen Menschen unter Asthma [52]. In westlichen Ländern sind etwa 20% der Bevölkerung von allergischen Atemwegsbeschwerden betroffen, 10% leiden sogar unter schweren allergischen Erkrankungen [53]. Der Anstieg der IgE-gesteuerten Allergien wird auf niedrigere Infektionsraten im Kindesalter zurückgeführt, was zum einen die T_H1/T_H2-Balance beeinflusst und zum anderen in weniger Keimzentren und mehr Überlebensnischen für langlebige Plasmazellen resultiert [38].

Die Pilzsporenbelastung übersteigt die Pollenzahl um ein Vielfaches, weshalb sie zu den Hauptursachen zählen. Im Falle der Sporeninhalation kann dies zu Atemwegserkrankungen wie allergischer Rhinitis und bronchialem Asthma führen [53, 54]. Im Gegensatz zu anderen

Allergieauslösern, sind Pilzsporen fast ganzjährig in der Umwelt vorhanden, können den menschlichen Körper besiedeln und durch Proteinsekretion Atemwege beschädigen und so die Lungenfunktion langfristig beeinträchtigen [54, 55]. Insbesondere in den Sommermonaten, wenn tagsüber die höchsten Sporenkonzentrationen gemessen werden, häufen sich Asthmaanfälle bis hin zum Asthmatod [56].

Etwa 12 Millionen durch Pilze ausgelöste Rhinosinuitiden, mehr als 10 Millionen Fälle von Pilz-assoziiertem Asthma und etwa 6,5 Millionen Patienten/-innen mit SAFS, dem schweren Asthma mit fungaler Sensibilisierung, wurden 2017 geschätzt [57]. Atopische Patienten/-innen haben hierbei ein höheres Risiko Asthma zu entwickeln, welches zudem oft schwer kontrollierbar ist [58, 59]. Zu den wichtigsten bekannten allergenen Pilzspezies, deren jeweiliger Hauptvertreter daher in der vorliegenden Studie verwendet werden sollte, zählen *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* und *Penicillium*. Für sie besteht Evidenz, dass ein Zusammenhang zwischen Pilzexposition und Schweregrad eines Asthmas vorliegt [51, 53, 54, 56, 60].

Im Rahmen des globalen Klimawandels, der mit erhöhten CO₂-(Kohlenstoffdioxid-) Konzentrationen verbunden ist, kommt es zu einer gesteigerten Sporenproduktion durch Schimmelpilze. Höhere CO₂-Konzentrationen führen zu höherer Biomasse und einem höheren Kohlen-Nitrogen-Quotienten, der den Pilzen als Ernährungsgrundlage zur Verfügung steht [61]. Somit gewinnt die *Aspergillus*-Diagnostik an Bedeutung.

1.4.2 Berufsbedingte Allergie

Als berufsbedingte Allergie, auf die etwa 15% der Asthmaerkrankungen im Erwachsenenalter zurückzuführen sind, bezeichnet man das Auftreten von allergischen Symptomen im Arbeitsumfeld nach einem initial freien Intervall, indem die immunologische Sensibilisierung stattfand [50]. Bei einer berufsbedingten Allergie spielen sowohl die individuelle Suszeptibilität als auch exogene Faktoren eine Rolle. Eine Atopie und genetische Faktoren führen zu einer individuellen Prädisposition. Die Höhe der Exposition, die wiederholte Konfrontation zum Reizstoff und eine feuchte Umgebung haben als exogene Faktoren ebenfalls einen Einfluss auf die Allergieentwicklung [21, 62].

Bei Schätzungen zu Folge weltweit jährlich 38.000 Todesfällen und 1,6 Millionen „Jahre verlorener Gesundheit“ (DALY) aufgrund von berufsbedingtem Asthma gilt es, Hochrisikoworker/-innen besser zu überwachen und Risikofaktoren sowie frühe klinische und biologische Marker einer berufsbedingten Allergie zu identifizieren [50]. Ob es durch die berufsbedingte, erhöhte *A. fumigatus*-Exposition bei Biolandwirten/-innen zur höheren

Allergie-Prävalenz kommt, kann im Rahmen der vorliegenden Studie anhand der Immunantwort besser nachvollzogen werden.

1.4.3 Typen der Hypersensitivität

Hypersensitivität kann nach Gell und Coombs in vier Klassen eingeteilt werden (siehe **Abbildung 5**). Im Gegensatz zu Pollen, können Pilzsporen und Myzelzellen alle vier verschiedenen Hypersensitivitätsreaktionen induzieren [54]. Zu den Krankheitsbildern, die *A. fumigatus* auslösen kann, gehören u.a. die extrinsische allergische Alveolitis, Asthma, allergische Sinusitis, chronisch eosinophile Pneumonie, Hypersensitivitätspneumonie, SAFS und ABPA [62].

Hypersensitivität nach Gell und Coombs	Typ-I	Typ-II	Typ-III	Typ-IV		
Immun-reaktant	IgE	IgG	IgG	T _H 1-Zellen	T _H 2-Zellen	CTL
Antigen	löslich	Zell-/ Matrix-assoziiert	löslich	löslich	löslich	Zell-assoziiert
Patho-mechanismus	Mastzell-Aktivierung	FcR-positive Zellen (Phagozyten, NKZ)	FcR-positive Zellen, Komplement, Immunkomplexe	Makrophagen-Aktivierung	Eosinophilen-Aktivierung	Zytotoxizität
Beispiel der Hypersensitivitätsreaktion	allergische Rhinitis, Asthma, systemische Anaphylaxie	Medikamenten-Allergie (Penicillin)	Serumkrankheit	Kontaktdermatitis, Tuberkulin-Reaktion	chronisches Asthma, chronische allergische Rhinitis	Kontaktdermatitis

Abbildung 5: Typen der Hypersensitivität nach Gell und Coombs [63]

Die **Typ-I**-Hypersensitivitätsreaktion ist vom Soforttyp und IgE-gesteuert [63]. Bei Allergenexposition wird IgE gebildet, welches an Mastzellen bindet. Durch die Quervernetzung von Rezeptor-gebundenen IgE-AK degranulieren die Mastzellen. Histamin sorgt für die sofortige, Leukotriene für die etwas verspätete Allergiesymptomatik. Die Histaminfreisetzung führt zu einer Vasodilatation, Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, wirkt proinflammatorisch und stimuliert Nozizeptoren [64, 65]. Werden die *A. fumigatus*-Sporen bei Sensibilisierung erneut eingeatmet, kommt es zur Quervernetzung der IgE-AK, die bereits auf Allergen-spezifischen Mastzellen oder Basophilen gebunden sind. Daraufhin kommt es zur sofortigen Sekretion von Mediatoren wie Histamin und Prostaglandinen. Wie schwer die klinischen Symptome letztendlich sind, variiert von einfachen Hautrötungen und allergischer Rhinitis bis hin zu lebensbedrohlichen allergischen Asthmaanfällen und anaphylaktischem Schock [54, 60].

Die **Typ-II**-Hypersensitivitätsreaktion beruht auf IgG-gesteuerten Antigen-AK-Interaktionen, die die Anaphylotoxin-Produktion (C5a) steigern und Leukozyten rekrutieren. Folge ist eine Gewebsverletzung durch hydrolytische Enzyme, die durch Autolyse der Neutrophilen

freigesetzt werden [64]. Im Gegensatz zu den anderen Hypersensitivitätsreaktionen ist hier das Antigen nicht löslich, sondern Zell- oder Matrix-gebunden [63].

Die **Typ-III**-Hypersensitivitätsreaktion ist durch die Ablagerung von Antigen-AK-Komplexen gekennzeichnet. Immunkomplexe werden bei der Abwehrreaktion gebildet, pathogen werden sie nur unter bestimmten Bedingungen abhängig von Größe, Anzahl, Affinität und Isotyp des Antikörpers. Als typisches Krankheitsbild bei Bauern/ Bäuerinnen, daher auch „*farmers lung*“ genannt, können die Sporen in hoher Konzentration zu einer IgG- statt IgE-vermittelten Immunantwort führen und sich bei erneuter Exposition in den Alveolarwänden absetzen. Dadurch wird der Blut-Gas-Austausch gedrosselt und die Lungenfunktion herabgesetzt [63].

Im Gegensatz zu den durch Antikörper vermittelten Sofortreaktionen, wird die verzögerte **Typ-IV**-Hypersensitivitätsreaktion von Antigen-spezifischen T-Zellen vermittelt [63]. Entsprechend der Immunabwehr von Pilzen, wird über MHC-II-Proteine das prozessierte Allergen präsentiert und führt zu einer pathologischen T_H2-dominanten Immunantwort [62]. Man vermutet auch eine Beteiligung von T_H17-Zellen, da die Schwere des Krankheitsverlaufs mit der IL-17-Sekretion korreliert [66]. Typische Krankheitsbilder nach Sporeninhalation sind chronisches Asthma und chronisch allergische Rhinitis [63].

1.4.4 B-Zellen und Allergie

Bei einem Asthmaanfall steigt die Zahl von B-Zellen sowohl im Blut als auch in der bronchialen Mukosa. B-Zellen kontrollieren die allergische Antwort durch die Regulation von T_H2-Typ-Zytokinen und Chemokinen. Bei Stimulus mit *Aspergillus*-Konidien kommt es zu einem enormen B-Zell-Influx in die Lunge. Die genauen Wirkweisen der B-Zellen in der Allergie sind bisher nicht geklärt, sicher ist aber ein bedeutender Einfluss auf das systemische Ergebnis [55].

1.5 A. fumigatus- assoziierte Krankheitsbilder

Neben Allergien kann *A. fumigatus* unter bestimmten Voraussetzungen zu schwerwiegenden Erkrankungen führen (siehe **Abbildung 6**).

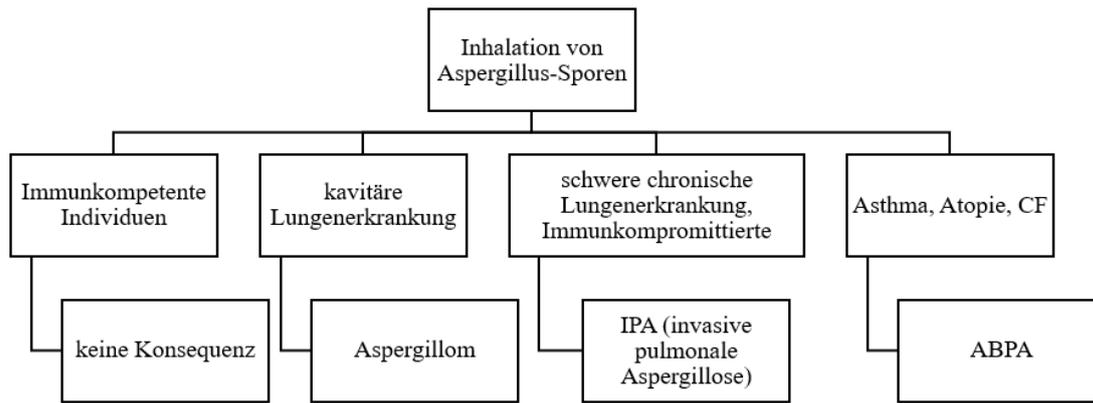


Abbildung 6: Klinisches Spektrum der pulmonalen Aspergillose. Je nach Immunsituation und pulmonalen Vorerkrankungen des Wirts/ der Wirtin hat die Inhalation von Aspergillus-Sporen verschiedene Auswirkungen. Während die Gesundheit von Immunkompetenten nicht beeinträchtigt wird, kann die Sporeninhalation je nach Prädisposition zu Krankheitsbildern wie dem Aspergillom, der IPA oder der ABPA führen [67].

Die angeborene Immunabwehr bei immunkompetente Individuen eliminiert die Sporen aus dem Atemweg, bevor sich pulmonale Pilzinfektionen manifestieren können. Bei vorgeschädigter Lunge mit Kavernenbildung (bspw. bei Patienten/-innen mit Lungentuberkulose) können sich Aspergillen als Aspergillom abkapseln und persistieren. Bei schweren chronischen Lungenerkrankungen und insbesondere bei Immunkompromittierten kann die Immunabwehr die Konidien nicht eliminieren, sodass sie die Atemwege kolonisieren, auskeimen und zu invasiven pulmonalen Aspergillosen (IPA) führen können. Atopische Individuen, Asthmatiker/-innen und Mukoviszidose-Patienten/-innen haben ein erhöhtes Risiko für eine ABPA (allergische bronchopulmonale Aspergillose).

1.5.1 Allergische bronchopulmonale Aspergillose

ABPA weist ein komplexes immunologisches Phänomen auf, das die Allergietypen I, III und IV vereint [54]. Sie äußert sich in einem hyperreagiblen Bronchialsystem mit systemischer Immunaktivierung, chronischen asthmatischen Beschwerden, Lungeninfiltraten und Bronchiektasen [68]. Keuchen, Schleim- und Bluthusten oder ein bräunliches Sputum mit Aspergillen sind relativ häufige Symptome. Zur Diagnosestellung werden u.a. eine erhöhte Anzahl spezifischer IgE-AK gegen *A. fumigatus*, sowie ein erhöhtes Gesamtserum-IgE (> 1000 IU/mL) und IgG-Antigen-AK-Komplexe herangezogen [9].

Prädisponiert sind vor allem Patienten/-innen mit bronchopulmonalen Vorerkrankungen: 1-2% der chronischen Asthmatiker und 2-15% der Mukoviszidose-Patienten/-innen sind betroffen [69]. Jedoch kann auch eine langanhaltende starke Schimmelpilzexposition, wie es in der Landwirtschaft, bei Hausrenovierungen und in der Nähe von Kompostieranlagen der Fall ist, die Erkrankung fördern [9]. Weltweit leiden vermutlich über 4,8 Millionen Menschen an ABPA

[70]. Es gibt Anhaltspunkte, dass regulatorische T-Zell-Defekte eine Rolle für die Erkrankung spielen. Ätiologischer Hintergrund ist eine prädominante T_H2-Antwort ohne Gewebsinvasion. Die Therapie basiert auf systemischen Glucocorticoiden wie Prednisolon für eine verminderte Immunaktivität und Antimykotika wie Itraconazol, um die Pilzlast zu senken [9].

1.5.2 Chronische pulmonale Aspergillose

411.000 ABPA-Patienten/-innen entwickeln als Komplikation eine CPA (chronische pulmonale Aspergillose) [70], bei insgesamt etwa 3 Millionen Betroffenen ist sie zu 40% Folge einer Lungentuberkulose [71]. CPA, die chronische pulmonale Aspergillose, früher als chronisch nekrotisierende Aspergillose (CNA) bezeichnet, hat einen fortschreitenden Verlauf [72]. Charakteristischerweise bilden sich langsam progredient Lungenhöhlen, Fibrose und Pleuraverdickungen. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 50% [71]. CPA bedeutet eine hohe Belastung für das globale Gesundheitssystem [73], ist jedoch schwer zu diagnostizieren, weil sie einerseits in ihren Symptomen anderen Lungenerkrankungen gleicht und es andererseits keinen sensitiven Diagnostest gibt. Letztendlich ist CPA bisher vielmehr eine Ausschlussdiagnose [71].

1.5.3 Invasive Aspergillose

IPA tritt normalerweise nur bei immunkompromittierten Personen auf. Wie ernst die Erkrankung ist, zeigen die Mortalitätsraten: mehr als 50% neutropenischer Patienten/-innen und 90% der Empfänger/-innen einer hämatologischen Stammzelltransplantation versterben [74, 75]. Weitere Risikofaktoren sind u.a. eine Lungentransplantation, eine fortgeschrittene AIDS-Erkrankung, eine lange und hohe Corticosteroidtherapie oder Leukämie. Selten tritt IPA auch bei Immunkompetenten auf. Zu den Risikogruppen zählen schwer betroffene COPD-Patienten/-innen und ernst erkrankte Patienten/-innen auf Intensivstationen [72].

Normalerweise beginnt die IPA im unteren Respirationstrakt. Symptome können ein trockener Husten, Fieber, pleuritische Thoraxschmerzen, Hämoptysen und bakterielle Superinfektionen sein, aber auch extrapulmonale Manifestationen insbesondere in Haut und Schleimhäuten oder im Gehirn sind möglich. IPA führt häufig zu Komplikationen. So kann eine Aspergilluspneumonie und eine septische Streuung bis hin zum disseminierten Organbefall Folge der Pilzerkrankung sein [72].

Die Diagnose einer IPA ist schwierig. Ein früher Beginn mit der Therapie hat aber einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebenschancen des Patienten/-innen. Bereits bei klinischem Verdacht auf eine IPA sollte mit der Behandlung begonnen werden [76], vorzugsweise mit Posaconazol, das ein breites Wirkungsspektrum hat. Als Erstlinientherapie

im Falle einer Diagnose wird Voriconazol für mindestens 6-12 Wochen eingesetzt. An der Entwicklung neuer Immuntherapeutika mit hoher Wirksamkeit und gutem Nebenwirkungsprofil wird geforscht [77]. Auch *P. chrysogenum* kann in immunkompromittierten Patienten/-innen eine invasive Schimmelpilzinfektion verursachen. Die Unterscheidung zur Aspergillose gestaltet sich insofern schwierig, als dass der Galactomannan-Test falsch positiv sein kann und das mikroskopische Bild der septalen Hyphen ähnlich ist [78].

1.6 Antigene des *A. fumigatus*

Der aktuelle Stand der Forschung über die einzelnen Antigene soll im Folgenden vermittelt werden. Als Übersicht dient **Tabelle 1**. In Anlehnung an das WHO/IUIS-Allergen-Nomenklatur-Subkomitee werden zunächst die „Asp f“-Allergene aufgeführt [79].

Unter den Antigenen des *A. fumigatus* befinden sich sowohl sezernierte, zytosolische, als auch Zellwand-Proteine des Schimmelpilzes. Da die Zellwand im ständigen Kontakt zum Wirt steht und dabei eine Vielzahl an Antigenen und Enzymen präsentiert, kommt ihr eine entscheidende Aufgabe zu [80]. Sie ist mit Proteinen ummantelt, die in der Regel über GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol-Anker) befestigt sind [81].

Tabelle 1: Aktuell in der Wissenschaft bekannte A. fumigatus-Antigene mit Aufgabe, Vorkommen und Größe (in der Studie verwendete Antigene)*

Bezeichnung	Aufgabe	Vorkommen	Größe
Aspf1*	Ribonuklease, Ribotoxin	sezerniert	18 kDa
Aspf2	Allergen, v.a. bei Zinkmangel exprimiert	Zytosol, sezerniert	37 kDa
Aspf3*	Peroxiredoxin-Reduktase	peroxisomal, sezerniert	19 kDa
Aspf4*	Allergen	Zytosol	30 kDa
Aspf5	Matrixmetalloprotease	Zytosol, sezerniert	40 kDa
Aspf6*	Manganase-Superoxid-Dismutase	Zytosol	26,5 kDa
Aspf7	Allergen		12 kDa
Aspf8*	ribosomales P2-Protein	Zytosol	11 kDa
Crf1/ Aspf9*	Zellwand-Glucanase	Zellwand	34 kDa
Aspf10	Aspergillopepsin	Zytosol, sezerniert	34 kDa
Aspf11	Peptidyl-Prolyl-Isomerase	Zytosol	24 kDa

Aspf12	Hitzeschockprotein	Zytosol	90 kDa
Aspf13	Serinprotease	Zytosol, sezerniert	34 kDa
Aspf15	Serinprotease (?)	Zytosol	16 kDa
Aspf16	Splicingvariante von Crf1?		43 kDa
Aspf17	Galactomannan-Protein	Zellwand	27 kDa
Aspf18	vakuoläre Serinprotease	Zytosol	34 kDa
Aspf22*	Enolase	Zytosol	46 kDa
Aspf23	ribosomales Protein L3	Zytosol	44 kDa
Aspf27	Cyclophilin	Zytosol	18 kDa
Aspf28	Thioredoxin	Zytosol, sezerniert	13 kDa
Aspf29	Thioredoxin	Zytosol, sezerniert	13 kDa
Aspf34	Phialiden- Entwicklungsprotein A	Zellwand	20 kDa
CatB*	Katalase	Zytosol, sezerniert	
CcpA	Strukturprotein der Konidien	Zellwand	
CipC*	unbekannt	Zytosol	
CsnB*	Chitosanase	sezerniert	
CspA	Strukturprotein	Zellwand	
Ecm33	Strukturprotein	Zellwand	
Eng2	Endo- β -1,3-Glucanase	Zellwand	
FG-gap	FG-gap repeat protein	sezerniert	
Gel1	β -1,3-Glucanosyltransferase	Zellwand	
HexA	Woronin-Körperchen-Protein	Zytosol	
Hämolyisin*	hämolytisches Toxin	Zytosol, sezerniert	
Pst2*	NADH-Ubichinon- Oxidoreduktase	Zellwand	
SHMT	Serin-Hydroxyl-Methyl- Transferase	Zytosol	

Aspf1, ein Mitglied der Mitogillin-Zytotoxine, fungiert als 18kDa Ribonuklease, die die Proteinsynthese effektiv hemmt und letztlich zur Apoptose der Zelle führt [82]. Sie wird auch Ribotoxin oder Restrictocin genannt [83]. Dabei spaltet Aspf1 spezifisch eine Einzel-Phosphodiester-Bindung des 28S rRNA-Genfragments [84]. Gemeinsam mit Gliotoxin ist Aspf1 hauptverantwortlich für die Wirtspathogenität [85]. Aspf1 löst eine proinflammatorische

Immunantwort aus, erhöht die NFκB-Aktivierung und stimuliert die Apoptose von unreifen dendritischen Zellen [84]. Außerdem wird eine inflammatorische IgE-vermittelte Immunreaktion initiiert [82].

Aspf2 ist in der Lage, die Plasmaregulatoren Faktor H, FHL-1, FHR1 und Plasminogen zu rekrutieren. Auf diese Weise unterbindet es einerseits die sofortige Immunantwort, da an Aspf2 gebundenes FH und FHL-1 C3b inaktiviert [86], womit die Funktionalität des Komplementsystems negativ beeinflusst [87] und die Phagozytose von Pilzbestandteilen vermindert wird. Andererseits dient die Rekrutierung von Plasminogen der Gewebepenetration. Sobald Plasminogen aktiviert wird, baut es Fibrinogen ab. Ist Plasmin an Konidien gebunden, kann es zudem Lungenepithelzellen schädigen. Die Zellen werden angeregt zu retrahieren und Matrix wird freilegt [86]. Amich et al. gehen außerdem davon aus, dass Aspf2, das dem Zinktransporter ZrfC im C-Terminus ähnelt, Zink binden und damit dem *A. fumigatus* das essenzielle Metall bereitstellen kann [88]. Aspf2 konnte als ABPA-Allergen identifiziert werden [89].

Bei **Aspf3** handelt es sich um eine Thioredoxin-Peroxidase, auch Peroxiredoxin genannt. Sie hat zur Aufgabe, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu inaktivieren. ROS werden vom angeborenen Immunsystem des Wirts zur Abwehr der *A. fumigatus*-Infektion produziert. Im Mausmodell mit IPA führte die Deletion von Aspf3 zur Abnahme der Virulenz von *A. fumigatus* [90].

Aspf4 und **Aspf6** sind weitere Allergene, die in der Diagnostik der ABPA Relevanz zeigen [89, 91]. Aspf6 dient als mitochondriale Manganase-Superoxiddismutase (MnSOD) und schützt so den Pilz vor Sauerstoffradikalen der Immunabwehr des Wirts. Es wird hochreguliert, wenn Konidien mit Neutrophilen oder dem oxidativen Produkt Menadion in Kontakt kommen [92]. Eine Kreuzreaktivität zur menschlichen MnSOD in Allergiepationen wurde nachgewiesen [93]. Die Funktion von Aspf4 hingegen ist noch unklar. Der IgE-Nachweis gegen beide Antigene zeigt bei ABPA-Patienten/-innen eine 100%ige Spezifität und >90%ige Sensitivität [91].

Aspf5, die auch als Mep bezeichnet wird, und **Aspf13**, auch bekannt als Alp1, sind sezernierte Proteasen des *A. fumigatus*, die im Pilzwachstum hochreguliert werden. Dabei fungiert Aspf5 als Matrixmetalloprotease und Aspf13 als Serinprotease [94]. Aspf13 kann Komplementregulatoren des Wirts, wie beispielsweise Faktor H, FHL-1 und Plasminogen, abbauen [95] und für die Ernährung des Pilzes Elastin, Keratin und Kollagen verwerten [96]. Ein Mutationstest hat ergeben, dass Aspf5 und Aspf13 am Eindringen ins Lungengewebe

wahrscheinlich unbeteiligt sind [97]. Werden Lungenalveolen und Bronchialepithel mit diesen Allergenen stimuliert, kommt es zu einer proinflammatorischen Immunantwort, morphologischen Veränderungen und Zellabschuppung [98].

Über **Aspf7** ist bisher nur seine allergene Wirkung bekannt [11].

Aspf8 ist ein saures ribosomales Phosphorprotein Typ 2 und wird daher auch P2-Protein genannt. Auf P2-Protein sensibilisierte Allergiepatrienten/-innen zeigen eine IgE-Immunantwort und eine starke Typ-1-spezifische Hautreaktion. Es besteht sogar eine Kreuzreaktivität zum humanen P2-Protein [93].

Crfl, auch als **Aspf9** in der Literatur zu finden, ist ein Zellwandprotein, das vom hoch konservierten *crfl-Gen* kodiert wird [99]. In vivo ist es vor allem in metabolisch aktiven Bereichen wie in der Wachstumszone, peripher an Infektionsherden oder bei Knospung und in Septen zu finden. Wird das *crfl-Gen* deletiert, kann man eine Wachstumsverminderung des *A. fumigatus* feststellen. Crf-Proteine spielen eine Rolle in der Zellwandintegrität. Es gibt Evidenz, dass sie als Transglykosylasen bei der Verbindung von Chitin mit β -1,3-Glucanen beteiligt sind [100]. Als GPI-verankertes Protein, kommt es unmittelbar in Kontakt mit der extrazellulären Umgebung [101]. T-Zellen, die gegen Crf1 gerichtet sind, zeigen überwiegend einen T_H1-Phänotyp mit dominantem IFN- γ -Zytokinprofil [102].

Aspf16 hat ein Molekulargewicht von 43kDa [61, 103] und zeigt dabei im N-Terminus hohe Sequenzhomologie zum 30,6kDa schweren Crf1. Möglicherweise handelt es sich um Splicingvarianten desselben kodierenden Gens. Nur bei ABPA-Patienten/-innen konnten hohe IgE-AK-Reaktionen auf das Allergen gezeigt werden, Asthmatiker/-innen mit positivem *Aspergillus*-Hauttest und Kontrollen zeigten dagegen keine Aspf16-spezifische IgE-Bindung [104].

Aspf10 bzw. Aspergillopepsin (PEP) ist eine Aspartat-Endoprotease und wird sezerniert, wenn der pH des Proteinmediums in den sauren Bereich absinkt. Da *A. fumigatus* aber auch noch über eine Glutamat-Protease (AfuGprA) verfügt, sichert bereits eine der beiden Proteasen das Pilzwachstum im Proteinmedium ab [105].

Aspf11 gehört zur Familie der Cyclophiline, die an vielen essentiellen Zellvorgängen beteiligt sind. Es handelt sich um eine zytosolische Peptidyl-Prolyl-Isomerase (PPIase) [11], die verschiedene Proteine neu faltet. PPIasen spielen vermutlich in der frühen T-Zellaktivierung eine Rolle [106]. Auch **Aspf27** ist ein Mitglied der Cyclophiline [61]. Cyclophiline wurden als

Panallergene identifiziert. Serum-IgE nach Umweltsensibilisierung kann mit humanen Cyclophilinen reagieren [107].

Aspf12 ist ein Hitzeschockprotein (Hsp1). Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die den *A. fumigatus* wärmetolerant machen, sodass er auch bei über 30°C gut wachsen kann [108].

Aspf15 ist vermutlich eine Serinprotease [103], **Aspf18** eine vakuoläre Serinprotease, die Kreuzreaktivität zu vielen anderen Pilzen aufweist [109, 110]. Die *Aspergillus*-Proteasen sorgen für das Wachstum des Pilzes und bauen im Rahmen ihrer Enzymaktivität die epitheliale Barriere in den Atemwegen ab. Der Protease-aktivierte Rezeptor 2 sei bei Asthmapatienten/-innen im Bronchialepithel höher exprimiert und induziere eine proinflammatorische Zytokinsekretion [111-113].

Aspf17, das auch Afmp1-Protein genannt wird, ist ein Galactomannan-Protein [108]. Als Bestandteil der Zellwand ist es möglicherweise an der Zell-Zell-Erkennung, Zelladhäsion und am Ionen- bzw. Nährstofftransport beteiligt. Eventuell agiert Aspf17 auch als Rezeptor [114]. Aspf17 ist ein Virulenzfaktor des *A. fumigatus*, da bei Funktionsverlust der Afmp1-4-Proteine Mäuse mit IPA überleben [115]. Der Einsatz zur Immunmodulation bei Risikopatienten/-innen wird überlegt [116].

Aspf22 ist eine zellwandständige Enolase, die im Kohlenhydratmetabolismus von *A. fumigatus* involviert ist. Sie leistet einen wichtigen Beitrag zur Bereitstellung von Zucker zur Zellwandsynthese und für den Energiehaushalt des Pilzes [117]. Aspf22 kann eine starke IFN- γ -Immunantwort auslösen [118]. Ein gezielt gegen die Enolase gerichteter monoklonaler AK (mAb R-5) könnte bei der Diagnose und Therapie von *A. fumigatus*-Infektionen hilfreich sein [119].

Aspf23, ein zum humanen ribosomalen Protein L3 homologes Protein (RpL3), ist Bestandteil der großen 60S-Untereinheit von Ribosomen und dort im Peptidyl-Transferase-Zentrum mitwirkend [120]. Eine Beteiligung von Aspf23 an der Vermittlung von Arzneimittelresistenzen wird vermutet [121].

Aspf28 und **Aspf29** sind Thioredoxine [61]. *A. fumigatus* verfügt mutmaßlich über fünf Thioredoxine. Unter oxidativem Stress werden sie vermehrt exprimiert, um Wasserstoffperoxid zu Wasser umzuwandeln und es so zu entgiften. Sie dienen demnach dem Schutz vor der Abwehrreaktion des Menschen bei einer Pilzinfektion [122].

Aspf34, auch Phialiden-Entwicklungsprotein A genannt, ist ein Zellwand-verankertes Hauptallergen [61]. Phialiden sind spezialisierte Zellen, die Stammzellen ähneln. Sie sind ständig mitotisch aktiv und produzieren differenzierte Konidien [123]. Aspf34 unterstützt die Differenzierung von Sporen, was dem Pilz ermöglicht, sich besser in der Umgebung verteilen zu können und gegen widerwärtige Bedingungen resistent zu sein [124]. Eine *phiA*-Funktionsverlustmutation führte zu reduziertem Wachstum und verminderter Sporulation [125]. Zudem hat Aspf34 Potential, einen spezifischen Hinweis auf *Aspergillus*-Sensibilisierung zu geben, da nur innerhalb der *Aspergillus*-Subspezies homologe Proteine existieren, darüber hinaus aber keine Kreuzreaktivität zu anderen Schimmelpilzen vermutet wird [124].

CatB steht für eine der drei Katalasen des *A. fumigatus*. Sie ist nur in Hyphen zu finden [102] und dient als vorübergehender Schutz vor der Wirtsabwehr. Neutrophile sezernieren Wasserstoffperoxid, das Hyphen zerstört. Katalasen sind in der Lage, H₂O₂ zu entgiften, allerdings kommen sie bei immunkompetenten Menschen in der Abwehr der reaktiven Sauerstoffspezies nicht hinterher und bieten demnach nur einen Teilschutz [126-128].

CcpA (Conidial cell wall protein A) ist ein wichtiges Protein von Pilzsporen, das auf der konidialen Zellwand reichlich vorkommt. Ihm wird aufgrund seines amphiphilen Charakters eine Strukturfunktion zugesprochen [129]. CcpA wird durch die Transkriptionskaskade aus BrlA, AbaA und WetA reguliert, die der asexuellen Entwicklung dient [130]. Ohne CcpA ist *A. fumigatus* leichter vom Immunsystem identifizierbar und wird dadurch schneller vernichtet. Grund hierfür ist, dass andere Proteine, die vom angeborenen Immunsystem schnell erkannt werden, an die Oberfläche geraten [129].

Bei dem zu **CipC** homologen Protein, dem „Concanamycin A induziertem Protein C“, handelt es sich um ein wichtiges, zytosolisches, monomeres, Hyphen-spezifisches Protein [131]. Der Name CipC hat seinen Ursprung in der Reaktion von *A. nidulans* auf Concanamycin-Antibiotikum, welches die vakuoläre ATPase hemmt. Dies führt zu einem sehr verzweigten Phänotyp [132]. Die genaue Funktion ist bisher ungeklärt [131], es besteht jedoch eine erhöhte Transkriptionsrate des CipC homologen Proteins bei steigender CO₂-Konzentration. Diese kann im Laufe einer Infektion von 0,033% auf bis zu 5% im Wirt ansteigen und Anpassungsreaktionen des Pilzes erforderlich machen [133]. Zu CipC homologe Proteine sind ausschließlich in Pilzen zu finden [131].

Die sezernierte Chitosanase **CsnB** dient vermutlich der Zellwandintegrität von *A. fumigatus*. Chitosan ist ein Polysaccharid, das durch Deacetylierung aus Chitin entsteht und von Hyphen

als Kohlenhydratquelle verwendet werden kann. CsnB hydrolysiert β -1,4-Bindungen zwischen D-Glucosaminen, wodurch es am Abbau der Zellwand von Pilzen beteiligt ist [134, 135].

CspA (Cell surface protein A) spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität und Integrität der Zellwand. Gemeinsam mit **Ecm33**-homologem Protein dient es dem Schutz vor Makrophagen und Neutrophilen, indem es darunter liegende Schichten aus Chitin und β -Glucan vor der natürlichen Immunantwort des Wirts verdeckt [80, 136]. Außerdem ist CspA an der Bildung eines intakten Biofilms beteiligt, welcher unter anderem einen Schutz vor Antimykotika bietet [137].

Eng2 kodiert für eine Endo- β -1,3-Glucanase, die nur in filamentösen Pilzen zu finden ist. Sie kann Oligosaccharide transferieren, scheint aber keinen Einfluss auf den Wachstumsphänotyp zu besitzen [138]. Beim Substrat β -1,3-Glucan handelt es sich um das Hauptpolysaccharid der mykotischen Zellwand [139].

FG-GAP repeat Proteine haben eine **Phenylalanyl-Glycyl-Glycyl-Alanyl-Prolyl**-Domäne. Sie ist wichtig für Protein-Protein-Interaktionen, insbesondere zwischen Integrinen und deren Liganden [140]. Es zählt zu den Proteinen, die mit am häufigsten im Sekretom von *A. fumigatus* vertreten sind. Seine Funktion ist bisher unbekannt. Vermutlich dient es der Kationenbindung oder ist Teil eines α -Integrins [96].

Bei **Gel1** handelt es sich um eine β -1,3-Glucanosyltransferase, die die β -Glucane der Zellwand verlängert. Für ihre Funktion benötigt sie eine intakte N-Glykosylierung [141].

HexA (*hexagonal peroxisome protein*) ist ein sogenanntes Woronin-Körperchen-Protein. Woronin-Körperchen sind pilzspezifische Organellen, die im Falle von physischer Schädigung die septale Pore zwischen benachbarten Hyphenkompartimenten verschließen [142]. Zusammengesetzt werden sie an der Membran von Peroxisomen [143]. HexA, das im Zytosol vorliegt, gilt als Hauptstruktur der Woronin-Körperchen. und sorgt durch seinen Schließmechanismus für Stressresistenz gegenüber physikalischen Verletzungen und Zellwandangriffen, insbesondere in Wachstumsphasen [144, 145].

Hämolysin (Hly), auch als Asp-Hämolysin in der Literatur zu finden, fungiert als hämolytisches Toxin. Es wirkt zytotoxisch auf Neutrophile und Makrophagen und hemmt gemeinsam mit anderen *A. fumigatus*-Mykotoxinen wichtige Leukozytenfunktionen. Hieraus resultiert eine verminderte Migration, geringere Produktion von ROS und fehlende antimykotische Funktion [146]. Zudem hat synthetisch hergestelltes *Aspergillus*-Hly-ähnliches

Peptid eine hohe Bindungskapazität zu oxidiertem LDL (*low density lipoprotein*), welches zytotoxisch auf Endothelzellen wirkt und die Atherogenese initiieren kann [147, 148].

Pst2 (*protoplast secreted protein 2*) wird unter oxidativem Stress vermehrt gebildet [149]. In der mitochondrialen Atmungskette fungiert Pst2 mit seiner 23kDa-Untereinheit als NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase [150]. Pst2 translokalisiert also als Komplex I Elektronen von NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) auf Ubichinon, was gleichzeitig dazu führt, dass Protonen über die innere Mitochondrienmembran translozieren. Letztendlich kann mit Hilfe des aufgebauten Protonengradienten ATP synthetisiert werden [151]. Bei invasiver pulmonaler Aspergillose sinkt der Sauerstoffgehalt. *A. fumigatus* muss sich dementsprechend an die Hypoxie anpassen. Man geht davon aus, dass selbst bei geringer Sauerstoffsättigung, die mitochondriale Atmungskette noch Energie bereitstellen kann [151].

SHMT ist eine **Serin-Hydroxyl-Methyl-Transferase**, die für Biosynthesen C-Einheiten verfügbar macht [152]. Sie ist stark immunogen im Sinne einer proinflammatorischen Immunantwort [153] und ist für die DZ-Immunmodulation als neuerem antimykotischem Therapieansatz interessant [154].

1.7 Kreuzreaktivität des *A. fumigatus*

Das Phänomen der Kreuzreaktivität ist bei *Ascomycota*, zu denen *Alternaria alternata* (*A. alternata*), *A. fumigatus*, *Cladosporium herbarum* (*C. herbarum*) und *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*) zählen, weitverbreitet [54]. Unter Kreuzreaktivität versteht man die Bindung von IgE-AK an ein strukturell ähnliches Allergen, das aber nicht dem ursprünglichen Auslöser der Allergie entspricht [155]. Die IgE-Kreuzreaktivität ist auf die >50% sequenzielle Übereinstimmung und architektonische und physikochemische Ähnlichkeiten zwischen homologen Allergenen zurückzuführen. Homologe Proteine können sich demnach B-Zell-Epitope teilen [156, 157].

IgE-AK gegen *A. fumigatus*-Allergene bedeuten daher nicht zwangsläufig, dass dieser Schimmelpilz auch tatsächlich der ursprüngliche Sensibilisierungsgrund war. Die vakuoläre Serinprotease von *C. herbarum* zeigt bspw. Kreuzreaktivität zu Asp f18 [54, 156, 158].

Ein weiteres Beispiel ist die T_H17-Immunantwort, die v.a. durch *Candida albicans* (*C. albicans*) ausgelöst wird. Bei Darmentzündungen nimmt die Anzahl an *C. albicans*-spezifischen T_H17-Zellen zu, was direkte Auswirkung auf ABPA-Patienten/-innen hat. Ihre pulmonale Entzündung wird durch die kreuzreaktiven T-Zellen angeheizt [159].

Auch hoch konservierte humane Selbstantigene, die strukturelle Ähnlichkeit zu Umweltallergenen haben, können stressinduziert T-Zell-Proliferation und Hautreaktionen hervorrufen und zur Aufrechterhaltung von chronischen Allergierkrankungen beitragen. Hohe Kreuzreaktivität besitzen insbesondere phylogenetisch hoch konservierte Proteine wie MnSOD, Cyclophilin, Thioredoxin, Enolase und ribosomales Protein P2 [54, 160].

Ein Vergleich eines *A. fumigatus*-Lysats mit *A. alternata*-, *C. herbarum*- und *P. chrysogenum*-Lysaten könnte Kreuzreaktionen teilweise aufdecken und weiteren Aufschluss über die Differentialdiagnose geben. Spezies-spezifische Antigene können möglicherweise zwischen Co-Exposition, Co-Sensibilisierung und Kreuzreaktivität unterscheiden [54, 156, 158].

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Bei zunehmender klinischer Relevanz von allergischen Erkrankungen durch *A. fumigatus*, die neben einer Einschränkung der Lebensqualität zu schwerwiegenden Erkrankungen und Todesfällen führen können, ist eine adäquate Diagnostik und Wissen über Risikofaktoren unabdingbar.

Als Grundlage für valide Ergebnisse ist eine genaue Definition des Testablaufs und das Ausschalten von externen Störungsquellen unerlässlich. Eine Rolle spielen hierbei der zeitliche Ablauf, die Proteinkonzentration und Reinheit der Lysate und Antigene, mögliche LPS-Kontaminationen und Kreuzreaktivität zu verwandten Spezies.

Als Testverfahren der Hauptstudie wird zur Quantifizierung der spezifischen T_H-Zellen das ELISpot-Verfahren, für das IgE-Profil der Western Blot herangezogen.

In der vorliegenden Studie liegt das Hauptaugenmerk auf dem Vergleich zwischen Biolandwirten/-innen, Langzeitexponierten und niedrig Exponierten, um zu ermitteln, welchen Einfluss das Level der *A. fumigatus*-Belastung auf Antigen-spezifische T-Zell- und IgE-Antworten hat. Dazu werden auch die T_H1/T_H2-Balance und die T_H17-Antwort mit in Betracht gezogen. So wird sich der Frage genähert, ob eine wiederholte, hohe Schimmelpilzbelastung die Wahrscheinlichkeit, eine Allergie zu entwickeln, erhöht. Hier wird insbesondere auf die Typ I- und Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion nach Gell und Coombs geachtet. Außerdem wird in bisher nicht vorhandener Breite herausgearbeitet, welche der bis dato bekannten *Aspergillus*-Antigene für eine Diagnostik in Frage kommen, indem sie zwischen den verschiedenen Expositionsniveaus differenzieren können. Damit wären sie für ein Biomonitoring in Zukunft denkbar.

2. Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die Nummer des Ethikvotums lautet 178/16.

2.2 Materialien

2.2.1 Technische Ausrüstung

Kühl- und Gefrierschränke	Comfort	Liebherr
	MedLINE	Liebherr
	Premium	Liebherr
Vortexer	Harmony Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS Laboratory and Medical Supplies
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Heizblock	neoBLOCK 1	neoLab
Zentrifugen	Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific
	Megafuge 16 Centrifuge	Thermo Scientific
	Multifuge 3s	Thermo Scientific
	Sunlab Mini-Zentrifuge	neoLab
Sterilwerkbank	HERAsafe	Thermo Electron Corporation
Inkubatoren	HERACELL 150i CO2 Incubator	Thermo Scientific
	HERATHERM Incubator	Thermo Scientific
	Minitron	INFORS HAT
Gerät für DC Protein Assay	Reader GENios	Tecan
Gerät für ELISpot-Analyse	BIOREADER® -5000 E	Biosys
Geräte für Gelelektrophorese und Western Blot	BlueFlash - M	SERVA Electrophoresis
	MR-1 Mini-Rocker Shaker	Biosan
	PowerPacBasic	Bio-Rad
	Standard Power Pack P25	Biometra
Waagen	KERN 440-33N	Kern&Sohn GmbH
	KERN AEJ 120-4M	Kern&Sohn GmbH
	Accu-Jet Pro	Brand

Dosierhilfen für Flüssigkeiten	BD Discardit II Spritzen	Becton Dickinson SA
	BD Plastipak 1 ml	Becton Dickinson SA
	Biosphere Filter Tips	Sarstedt
	Pipettierhilfe Macro	Brand
	Mikroliterpipetten Research Plus	Eppendorf
	Multipette M4	Eppendorf
	Pasteur Pipette 3 ml	Biosigma
	Serologische Pipetten Cellstar	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße	Cellstar Tubes 15 ml / 50 ml	Greiner bio-one
	SafeSeal Gefäße	Sarstedt
	LeucoSep™-Röhrchen	Greiner bio-one
Material für Blutabnahme und Wundversorgung	Cutasept F Haut-Desinfiziens	BODE Chemie
	Gazin Mullkompresse	Lohmann und Rauscher
	Leukomed Wundverband	BSN medical
	Multi-Adapter	Sarstedt
	S-Monovette 2,7 ml K3E	Sarstedt
	S-Monovette 7,5 ml LH	Sarstedt
	S-Monovette 7,5 ml Serum	Sarstedt
	S-Monovette 7,5 ml K3E	Sarstedt
	Venenstaubinde	Megro
	Venofix Safety 19G	B. Braun Melsungen AG
Material für mikrobiologische Arbeiten und die Zellkultur	Cell Strainer 40 µm Nylon	Falcon
	Dialysekanüle Plume-S A17L15SG	Plume
	Filtropur S 0,2	Sarstedt
	Hypodermie Needle-Pro Needle	B. Braun Melsungen AG
	Zählkammer Neubauer Improved	Assistent
	Zählkammer Neubauer Improved	Marienfeld
	Vi-CELL XR	Beckman Coulter
	Krepp-Klebeband	tesa

2.2.2 Reagenzien

	Anti-CD28 pure – functional grade, human	Miltenyi Biotec
--	--	-----------------

Reagenzien für Zellkultur und PBMC-Isolation	Anti-CD49d pure, human	Miltenyi Biotec
	Biocoll Separating Solution (1,077 g/ml)	Biochrom
	Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
	RPMI-Medium 1640 + Glutamax	Gibco
	Trypanblau	Fluka
Reagenzien und Kits für Arbeiten mit Proteinen	2x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad
	10x TBS	Bio-Rad
	10x TG	Bio-Rad
	10x TGS	Bio-Rad
	Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad
	Bead Tube Holder	Macherey-Nagel
	Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
	DC Protein Assay Kit	Bio-Rad
	Endochrome-K TM	Charles River Laboratories
	Chromatographiepapier / Gel-Blotting-Papier 190 g/m ²	A. Hartenstein
	Immun-Blot Assay Kit	Bio-Rad
	Methanol	Sigma-Aldrich
	Mini-PROTEAN TGX Precast Gels	Bio-Rad
	Simply Blue TM	Thermo Scientific
	NucleoSpin Bead Tubes Type A	Macherey-Nagel
	Precision Plus Protein Dual Xtra	Bio-Rad
	4x SDS Sample Loading Buffer	Sigma-Aldrich
	Protein A from Staphylococcus aureus	Sigma
	Protein G' from Streptococcus sp.	Sigma
	PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membrane	Whatman
Tween20	Sigma	
steriles Wasser	Berlin-Chemie Menarini	
Standards		

Reagenzien für mikrobiologische Arbeiten	Bierwürz-Agarplatten	IHM Würzburg
	RPMI (IHM)	IHM Würzburg
Pilzstämme	<i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<i>Alternaria alternata</i>	
	<i>Clostridium herbarum</i>	
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
rekombinante A. fumigatus Antigene	Aspf1 (Afu5g02330)	AG Ebel (Elisabeth Schnack), LMU München [161]
	Aspf3 (Afu6g02280)	
	Aspf4 (Afu2g03830)	
	Aspf6 (Afu1g14550)	
	Aspf8 (Afu2g10100)	
	Crfl (Afu1g16190)	
	Aspf22 (Afu6g06770)	
	CatB (Afu3g02270)	
	CipC (Afu5g09330)	
	CsnB (Afu4g01290)	
	FG-gap (Afu1g04130)	
	Hämolysin (Afu3g00590)	
Pst2 (Afu1g13670)		
A. fumigatus- Lysat		Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie in Jena
Software	Microsoft Office 2016	Microsoft
	EndNote ^{x9}	Clarivate Analytics
	Image Lab 5.2	Bio-Rad
	Statistica	StatSoft

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig mit der Software Statistica von StatSoft und Excel von Microsoft Office 2016.

2.3 Methoden

2.3.1 Herstellung von Pilzlysaten

Für die vorliegende Studie wurden Lysate von *A. fumigatus*, *A. alternata*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* produziert. Diese bestanden aus den Hyphen der Pilze.

2.3.1.1 Pilzanzucht

Die Anzucht und Prozessierung der Pilze wurde unter Einhaltung der Bio-II-Gefahrenstufe durchgeführt. Je 50µL der Konidiensuspensionen des jeweiligen Pilzes wurden auf Bierwürz-Agarplatten (IHM Würzburg) ausgestrichen. Danach wurden die Platten mit Krepp-Klebeband (tesa) umwickelt und in den Inkubator (Thermo Scientific) gestellt. Die Temperatur wurde an den optimalen Wachstumsbedingungen der jeweiligen Subspezies orientiert. Für *A. fumigatus* wurde eine Anzucht bei 37°C durchgeführt, *A. alternata*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* wurden bei 25°C inkubiert. Nach drei Tagen konnten die Pilze geerntet werden.

2.3.1.2 Pilzernte

25mL steriles Wasser (Berlin-Chemie Menarini) wurde auf die zu erntende Bierwürz-Agarplatte gegeben, sodass der gesamte Pilz mit Flüssigkeit bedeckt war. Mit Hilfe eines Wattestäbchens wurden die hydrophoben Konidien vom Pilz abgeschabt. Die Pilzsuspension wurde in einer serologischen Pipette aufgenommen, erneut auf die Platte gegeben und die Sporen wurden nochmals abgetragen. Anschließend wurde dieselbe Flüssigkeit auf die nächste Bierwürzplatte überführt und mit zusätzlichem sterilem Wasser wieder auf 25mL aufgefüllt, da ein Teil des Wassers im Pilz versickerte. Auf dieselbe Weise wurden alle Platten eines Pilzes geerntet, bis am Ende der Prozedur eine trübe Pilzsuspension entstanden war. Diese wurde im *Cell Strainer* (Falcon) von Hyphenbestandteilen gereinigt.

In der Neubauer-Zählkammer (Marienfeld) wurde die Konidienkonzentration in einer 10² Verdünnung bestimmt.

2.3.1.3 Hyphenwachstum

Zur Anzucht von Hyphen aus Konidien wurden in 50mL *Falcontubes* je 20mL RPMI (IHM Würzburg) und 1x10⁷ Konidien gegeben. Um die Gefahr einer bakteriellen Kontamination zu senken, wurden 2µg Penicillium-Streptomycin (RPMI mit 0,1 µg/mL PenStrep) hinzugefügt. Bei 25°C und 200 RPM (englisch: *rounds per minute*) wurden die Sporen für etwa 17 Stunden (*A. fumigatus*) bzw. 65 Stunden (*A. alternata*, *C. herbarum*, *P. chrysogenum*) inkubiert. Dabei war der Deckel der *Falcontubes* um je 45° geöffnet, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

2.3.1.4 Hyphenlysat

Ein neues 50mL *Falcontube* wurde abgewogen, um später das Gewicht des gewonnenen Hyphenextrakts bestimmen zu können.

Die Hyphensuspension wurde bei 5000g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Hyphenmasse mit 5 mL PBS (Sigma-Aldrich) erneut resuspendiert. Je 5 der verschiedenen Ansätze wurden zusammengegeben. Die Flügel einer 17g *Butterfly*-Kanüle wurden steril abgeschnitten, um eine Kontamination durch versehentliche Berührung des Randes des *Falcontubes* zu verhindern, und anschließend an eine 20mL Spritze angedockt. Durch mehrfaches Aufziehen und Entleeren der Spritze wurden die Hyphenbestandteile in der Suspension zerkleinert und homogenisiert. Anschließend wurde das Pilz-Homogenisat erneut bei 5000g für 10 Minuten zentrifugiert und durch einen *Cell Strainer* gefiltert. Die aufgefangene Biomasse wurde in dem bereits abgewogenen 50mL *Falcontube* gesammelt und die Trockenmasse gewogen.

Das Hyphenextrakt wurde auf 700 mg/mL verdünnt, je 350µL in eine Keramik-*Bead-Tube* (*NucleoSpin Bead Tubes Type A*, Macherey-Nagel) gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt [162, 163].

Um zu eruieren, nach welcher Zeit die Proteinkonzentration am höchsten ist, wurden nach 1,2,3,4 und 5 Minuten je 15µL Flüssigkeit entnommen und in einem *Protein Assay* analysiert. Das *Bead-Tube* wurde jeweils wieder mit 15µL PBS aufgefüllt, um ein konstantes Volumen zu erhalten. Da bei *C. herbarum* die Lysatkonzentration konstant niedrig blieb, wurden weitere größere Zeitintervalle ebenfalls untersucht. Hier wurden alle 5 Minuten bis 40 Minuten Proteinproben entnommen.

Die restliche Hyphensuspension wurde ebenfalls zu je 350µL in *Keramik-Bead-Tubes* gegeben und für die zuvor bestimmte Zeit des maximalen Proteingewinns geschüttelt. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den *Keramik-Bead-Tubes* entnommen, in einem *Falcontube* zusammengeführt, steril gefiltert und die Endkonzentration im *Protein Assay* bestimmt.

Um eine LPS-Kontamination auszuschließen, wurden die Lysate von der Lophius Biosciences GmbH in Regensburg mittels Endochrome-KTM (Charles River Laboratories) auf ihre Endotoxin-Konzentration hin untersucht.

In Kooperation mit dem Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie in Jena wurde deren *A. fumigatus*-Lysat als Backup mitgeführt für den Fall, dass der eigene

Herstellungsprozess nicht LPS-frei funktioniert. Dieses importierte Lysat wird im Folgenden als „Afu“ bezeichnet.

2.3.2 Protein-Quantifizierung

Die verwendeten *A. fumigatus*-Antigene wurden von der kooperierenden Arbeitsgemeinschaft Ebel der LMU München bereitgestellt [161].

2.3.2.1 DC Protein Assay

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen wurde der DC Protein Assay (Biorad) angewandt. Es wurde das Protokoll nach BioRAD DC™ Protein Assay angewandt, das auf dem Lowry-Test basiert [164]. Die Reagenz B wird u.a. durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan der Proteine reduziert, was zu einem blauen Farbumschlag führt. Je höher die Proteinkonzentration, desto stärker die Farbreaktion. Ein Photometer kann dies detektieren. Mittels einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen sind daher Rückschlüsse auf die Konzentrationen der unbekannt Proteinen möglich [165].

Bovines Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) wurde als Standardreferenz verwendet. Dabei wurde BSA zu 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 und 0 mg/mL in PBS für die Lysatkonzentration bzw. in 1 molarem Harnstoff für die Antigene verdünnt. Das entspricht jeweils dem Puffer, in dem die Proteine gelöst sind.

Auf einer Mikroplatte wurden je 5 µL der Standards und des zu untersuchenden Proteins aufgetragen, wobei je zwei Vertiefungen identisch gefüllt wurden. Hierbei handelte es sich um die verwendeten Protein-Antigene des *A. fumigatus*: Aspf1, Aspf 3, Aspf 4, Aspf 6, Aspf 8, Crf1, Aspf22, CatB (N-terminus), CipC, CsnB, FGgap, Hly, Pst2 und Lysate von *A. fumigatus* sowie *A. alternata*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* und Afu (Jena).

Anschließend wurden je 25 µL der Reagenz A' (bestehend aus 20 µL S zu 1mL A) hinzugefügt. Zuletzt wurden je 200 µL Reagenz B in die Vertiefungen pipettiert. Nach mindestens 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Absorption innerhalb einer Stunde bei 750nm am Photometer (Tecan) gemessen.

2.3.2.2 Coomassie

Um Proteine mittels Coomassie anzufärben, müssen diese zunächst aufgetrennt werden. Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Trennung von Proteinen nach der Molekülmasse in einem elektrischen Feld [166], sodass für die vorliegende Studie überprüft werden kann, ob die Pilzantigene rein und keine Verunreinigung durch Proteasen o.ä. vorhanden sind. Dies würde sich durch fraktionierte Proteine zeigen. Außerdem kann anhand der Balkenstärke im Vergleich zum Referenzbalken überprüft werden, ob die

Proteine in gewünschter Konzentration vorliegen. Die verwendeten Antigene des *A. fumigatus* wurden basierend auf der Konzentrationsbestimmung in den Protein-Assays mittels PBS auf 1 μg verdünnt, das Lysat auf 7,5 μg . 15 μL des PBS-Antigen-Gemisches und 5 μL 4x SDS (Loading Buffer, Sigma Aldrich) als Detergenz wurden jeweils in ein *safe seal* Eppendorf (Sarstedt) gegeben und anschließend bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Dadurch denaturieren die Proteine und werden negativ geladen.

Die verschiedenen Antigene wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 30mA für 90 Minuten im TGS-Puffer (Bio-Rad) laufen gelassen. Durch SDS werden die denaturierten Proteine stark negativ geladen und wandern so entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode. Je kleiner das Antigen, desto weiter gelangt es im Gel.

Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, Bio-Rad) aus der Kammer entfernt und dreimal in VE-Wasser gewaschen, bevor es in Simply Blue™ (Thermo Scientific) für 1 Stunde geschwenkt und damit eingefärbt wurde. Zuletzt wurde mit VE-Wasser der Hintergrund über Nacht entfernt.

Je mehr Proteinmenge vorhanden, desto höher die Farbintensität der Linie. Um zu überprüfen, ob die gewünschte Konzentration erreicht wurde, welche im DC Protein Assay zuvor eruiert wurde, wurde BSA als Referenz mitgeführt. Für den Western Blot ist eine genaue Konzentrationsanalyse wichtig, da sonst die B-Zellantwort in der vorliegenden Studie nicht quantifiziert werden kann. Außerdem konnte das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden über eine ebenfalls mitgeführte *Ladder* (Precision Plus Protein Dual Xtra, Bio-RAD) identifiziert werden.

2.3.3 Analyse von T-Zellen im Rahmen der *A. fumigatus*-Immunantwort

2.3.3.1 Studienpopulation

Mit dem Ziel, die Immunreaktion von beruflich Exponierten zu *A. fumigatus* seit mindestens 1 Jahr im ökologischen Landbau mit einer Kontrollgruppe bestehend aus Probanden/-innen ohne beruflichen Kontakt zu diesem Pilz zu vergleichen, wurden je 10 Blutspender innerhalb der Studienpopulationen untersucht. Die Biolandwirte/-innen wurden mittels EU-Zertifikationen authentifiziert (Demeter, Naturland, A-B-CERT, Kontrollverein ökologischer Anbau e.V.). Die Kontrollgruppe wurde zusätzlich in je fünf Probanden/-innen mit hoher bzw. niedriger Exposition im Lebensumfeld unterteilt. Als Kriterien für die Gruppeneinteilung wurden die von Wurster et al. 2017 aufgestellten Kategorien der potenziellen Risikofaktoren für Schimmelpilzbelastung herangezogen [42]. Berücksichtigt werden hierbei unter anderem die Einwohnerzahl (< 2.000) für kumulativ mindestens 5 Jahre, Agrarflächen oder Weinberge in

weniger als 1 Kilometer Entfernung von der eigenen Wohnung, sowie eine pflanzenreiche oder verschimmelte Wohnung. Bei Kombination einer Langzeitexposition und einer weiteren momentan zutreffenden Kategorie wurde der Proband/ die Probandin als hochexponiert eingestuft [42].

Ausschlusskriterien für beide Kohorten waren Schwangerschaft, akute Infektionen, antimikrobielle Therapie binnen der letzten 12 Wochen und allergische Erkrankungen, die binnen der letzten 12 Wochen immunmodulatorische Therapien notwendig machten. Die gesunden Spender/-innen haben nach Aufklärung eine entsprechende Einverständniserklärung unterschrieben. Für die Studienteilnehmer/-innen ergaben sich die in **Tabelle 2** aufgelisteten demographischen Charakteristika.

Tabelle 2: Demographische Charakteristika der Studienteilnehmer/-innen

Demographie	berufsbedingte hohe Exposition	Kontrollgruppe	
		hohe Exposition im Lebensumfeld	niedrige Exposition im Lebensumfeld
Alter [Jahre] (Mittelwert)	34,1 J.	29,6 J. (34,4 J. bzw. 24,8 J.)	
Altersspanne	18-70 Jahre	22- 65 Jahre	
Geschlecht	9 Männer, 1 Frau	3 Männer, 2 Frauen	1 Mann, 4 Frauen
Schimmelpilzbelastung	Bio-Landwirtschaft, Bio-Weinbau	Dorf < 2.000 Einwohner, Kleinstadt und < 1 km Entfernung zu landwirtschaftlichen Nutzflächen/Weinbergen, residentielle Faktoren	Stadt > 20.000 Einwohner

2.3.3.2 Blutentnahme

Das Blut wurde mit einer *Venofix Safety* 19G Kanüle aus der Kubitalvene abgenommen. Im Gegensatz zu den in der Klinik häufig üblichen kleineren Nadeln wurde diese bevorzugt, da so eine schnellere Blutentnahme möglich war und sich weniger Neutrophilenaggregate ansammeln konnten. Entsprechend der Hygienestandards wurde die Einstichstelle zweimal desinfiziert und die Einwirkzeit von 30 Sekunden beachtet. Als Blutröhrchen wurden S-Monovetten der Firma Sarstedt verwendet, die mit Lithium-Heparin, einem Gerinnungsaktivator für die Serumgewinnung bzw. EDTA befüllt waren.

2.3.3.3 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Für die T-Zell-Versuche wurden mononukleäre Zellen des peripheren Bluts, die sogenannten PBMCs, verwendet. Sie setzen sich aus Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen zusammen [167] und wurden aus Lithium-Heparin-Blut gewonnen. Da präanalytische Aufbewahrung und PBMC-Kryopräservierung einen

erheblichen Einfluss auf die Messergebnisse haben [168], wurden die frisch abgenommenen Blutproben sofort weiterverarbeitet, sodass innerhalb eines Zeitfensters von 30 Minuten die PBMCs extrahiert worden sind.

Das Blut von je 3 Lithium-Heparin-Röhrchen à 7,5mL wurde mit 9mL PBS vermischt. Mit Hilfe von LeucoSep™-Röhrchen (Greiner bio-one) und 15mL *Biocoll Separating Solution* (Biochrom) wurden die PBMCs isoliert. Dies geschah anhand einer Dichtegradientenzentrifugation. Während Erythrozyten, tote Zellen und Granulozyten eine höhere Dichte besitzen und sich damit als Sediment absetzen, sammeln sich die PBMCs nach 20-minütiger Zentrifugation bei 600g als weiße Zellschicht zwischen Plasma und Biocoll (siehe schematische **Abbildung 7**).

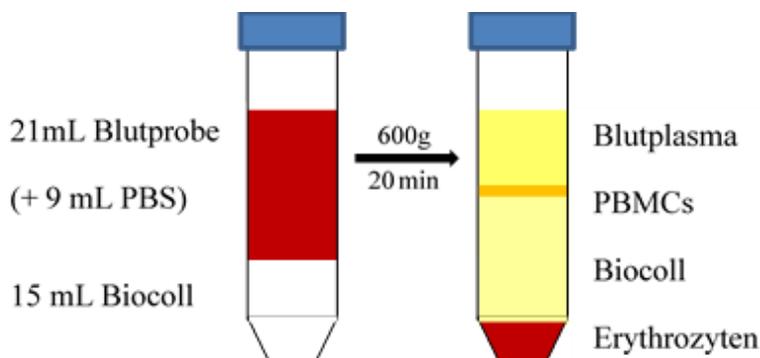


Abbildung 7: PBMC-Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation [2]. Auf eine 15mL-Biocoll-Schicht werden 21mL Blut aus Lithium-Heparin-Röhrchen und 9mL PBS gegeben. Nach 20min Zentrifugation mit 600g erfolgte eine dichteabhängige Phasenaufteilung. Die PBMCs befinden sich in der Interphase zwischen Blutplasma und Biocoll. Sie können nun vorsichtig isoliert werden. Die Erythrozyten haben sich aufgrund ihres hohen Eigengewichts am Boden abgesetzt.

Die Interphase aus PBMCs wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in einen 50mL-Falcontube überführt. Die gewonnene Zellsuspension wurde zum Aufreinigen auf 45mL mit CTL-Wash (45mL RPMI, 5mL CTL-Wash, 500µL Glutamin; 37°C) aufgefüllt und bei 300g für 10 Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde scharf abgenommen, sodass nur das Zellpellet übrig bleibt. Dieser Waschschrift hilft insbesondere Thrombozyten zu entfernen, die sich aufgrund ihrer geringeren Dichte im Überstand befinden. Zur Zellzahlbestimmung im Hämozytometer (Vi-CELL XR) wurde das Zellpellet erneut in 5mL CTL-Wash gelöst, 10µL entnommen und mit 490µL PBS auf 1:50 verdünnt. Die Viabilität maß bei allen Zellpräparationen größer 95%. Nach erneuter Zentrifugation bei 300g für 10 Minuten, wurde basierend auf den Ergebnissen der Zellzahlmessung die Zellkonzentration mittels CTL-Test-Medium (50mL CTL-Test, 500µL Glutamin; 4°C) auf 2×10^6 Zellen pro mL für den ELISpot eingestellt. Für das FACS wurden die Zellen mit RPMI-Serum (9,5 mL RPMI und 500 µL inaktiviertes, steriles Serum des Spenders/ der Spenderin) auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen pro mL gebracht. Dabei wurde beachtet, dass durch die erneute Zentrifugation etwa 15,4% Verlust zu verzeichnen ist, wie in Vorversuchen bestimmt wurde. Im Anschluss wurden

die isolierten PBMCs unverzüglich im ELISpot-Verfahren bzw. FACS verwendet. Das FACS-Verfahren wurde in einer thematisch gekoppelten Doktorarbeit durchgeführt.

2.3.3.4 ELISpot

Bei einem ELISpot-Verfahren (*enzyme-linked immunosorbent spot*) handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, um antigenspezifische Effektorzellen auf Einzelzellniveau nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Funktionsweise ist in **Abbildung 8** schematisch dargestellt. Werden T-Zellen aktiviert, setzen sie Zytokine frei, um die Immunantwort zu regulieren. Diese Botenstoffe der Zellkommunikation werden in der ELISpot-Analyse mittels monoklonaler AK an eine feste Phase gebunden. Durch Zugabe von Detektions-AK und einer Substrat-Peroxidase-Reaktion werden die antigenspezifischen Zellen mit ihren umgebenden Zytokinhöfen sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Anzahl der Spots auf der Kulturplatte und der bekannten Anzahl der T-Zellen lässt sich feststellen, wie viele von ihnen Zytokine auf den jeweiligen Antigen-Stimulus freisetzen [169]. Untersucht wurden die Botenstoffe IFN- γ , IL-5 und IL-17A.

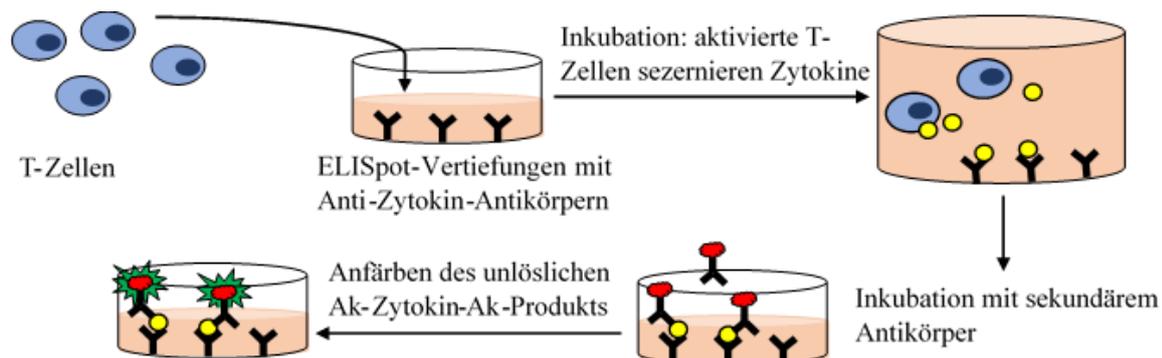


Abbildung 8: Funktionsweise des 1-schrittigen ELISpots [1]: Die ELISpot-Vertiefungen haben festgebundene Anti-Zytokin-AK und werden mit T-Zellstimulanzen versetzt. Bei Zugabe der PBMCs (vereinfacht der T-Zellen) und anschließender Inkubation sezernieren die aktivierten T-Zellen Zytokine, die von den Anti-Zytokin-AK gebunden werden. Nach Inkubation mit einem sekundärem AK können die unlöslichen AK-Zytokin-AK-Produkte in einem weiteren Schritt angefärbt werden.

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden von Lauruschkat et al. etabliert [168].

Für die ELISpot-Analyse von IFN γ , IL-5 und IL-17A wurde das T-Track[®]-Protokoll von Lophius Biosciences (Regensburg) angewandt. Entsprechend wurden IFN- γ - und IL-5-Kulturplatten mit 1 μ g/mL α -CD28 und 1 μ g/mL α -CD49d kostimuliert. Die Stimulation erfolgte mittels 12 verschiedener rekombinanter *A. fumigatus*-Proteine (Aspf1, Aspf3, Aspf4, Aspf6, Aspf8, Crf1, Aspf22, CatB, CipC, CsnB, Hämolyisin, Pst2), die von der kooperierenden Arbeitsgemeinschaft Ebel der LMU München zur Verfügung gestellt wurden [161], und dem Hyphenlysat Afu, das von der Abteilung für Infektionsbiologie und molekulare Biotechnologie des HKI Leibniz geliefert wurde.

Zudem wurden eine Positivkontrolle mit Phytohämagglutinin (1:10 mit AIM-V verdünnt), eine Negativkontrolle ohne Stimulantien und eine CTL-Test-Mediumkontrolle durchgeführt.

Je Pore wurden 50 μ L des Mastermixes aus jeweiligem Antigen (30 μ g/mL bei einem Volumen von 150 μ L pro Vertiefung, sprich 4,5 μ g) und der benötigten Kostimulatoren zugegeben, welche zuvor mit CTL-Test-Medium verdünnt worden sind. Für das Lysat wurde eine Konzentration von 50 μ g/mL verwendet. Die isolierten, resuspendierten PBMCs (2×10^6 Zellen pro mL) wurden zu je 100 μ L in den ELISpot pipettiert. Das bedeutet, dass sich in jeder Vertiefung ca. 200.000 PBMCs befanden (schematische Darstellung siehe **Abbildung 9**).

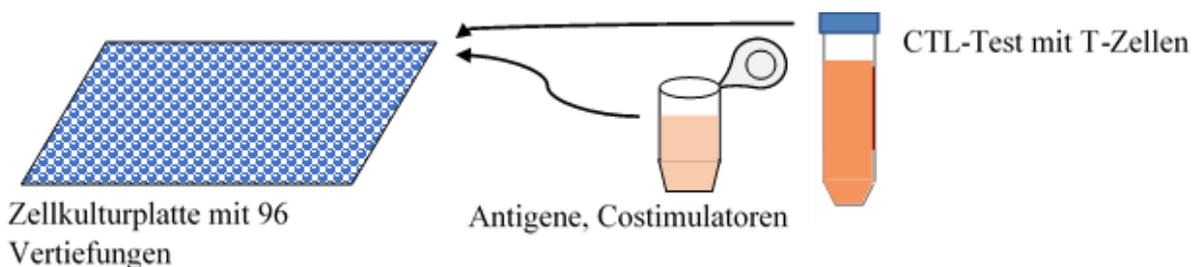


Abbildung 9: Vorbereitung der ELISpot-Analyse: In jede Vertiefung der ELISpot-Platten mit spezifischem gebundenen Anti-Zytokin-AK werden die zu testenden Antigene mit Costimulatoren hinzugefügt. Anschließend werden die sich im Nährmedium CTL-Test befindlichen T-Zellen hinzugegeben.

Nach 24 (+2) Stunden für IFN γ bzw. 44 (+4) Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ für IL-5 und IL-17A, wurden zunächst Zellsuspension und Medium der ELISpot-Kulturplatten ausgeleert und die Milliporen sechsmal mit 200 μ L Waschpuffer 1 (PBS angereichert mit 0,01% Tween20) gewaschen.

Die IFN- γ -Mikrotiterplatte wurde mit dem monoklonalen Antikörper alkalische Phosphatase (mAb-AP) versetzt. Dazu wurde der Antikörper im Verhältnis 1:180 mit Verdünnungspuffer (DB, *dilution buffer*) gemischt und je 100 μ L der mAb-AP-Arbeitslösung in die Vertiefungen des ELISpots pipettiert.

Die IL-5- und IL-17A-Kulturplatten wurden mit einem an Biotin gekoppelten monoklonalen AK, der spezifisch für IL-5 bzw. IL-17A ist (mAb-Biotin), auf Zytokin-sezernierende Effektorzellen getestet. Er wurde jeweils im Verhältnis 1:1000 mit DB verdünnt und ebenfalls zu je 100 μ L in die Mikroporen injiziert.

Nach 2 Stunden Inkubationszeit im Dunkeln bei RT wurden die AK-Lösungen wieder ausgeklopft und dreimal mit 200 μ L Waschpuffer 1, sowie dreimal mit Waschpuffer 2 (nur PBS) gewaschen.

Da es sich bei IL-5- und IL-17A-ELISpots im Gegensatz zum einschrittigen IFN- γ -Nachweis um ein Zweischnitt-Detektionssystem handelte, wurde hier ein weiterer Zwischenschritt im Versuchsablauf durchgeführt. Je 100 μ L Streptavidin-alkalische-Phosphatase (Strep-AP), auf 0,1% mit DB verdünnt, wurde in die Vertiefungen gegeben. Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei

RT und im Dunkeln wurde die Strep-AP-Lösung sechsmal mit 200µL Waschpuffer 2 ausgewaschen.

Zuletzt wurden die Vertiefungen aller ELISpots mit je 50µL Färbelösung versetzt, das für ein unlösliches Präzipitat, also die Spots, sorgt. Um die Farbentwicklung zu beenden, wurde die Mikrotiterplatte nach 6 bis 7 Minuten Einwirkzeit im Dunkeln bei RT 3-mal mit Leitungswasser abgewaschen, abgetupft und über Nacht im Dunkeln bei RT luftgetrocknet.

Die Auswertung der Kulturplatten wurde mittels des Bioreader® 5000 –E ausgeführt, das die Zellkulturplatte mikroskopiert und apparativ auszählt (siehe **Abbildung 10**).



Abbildung 10: Auswertung des ELISpots durch Zählung der Zytokinhöfe: Nach Inkubation und Anfärbung der AK-Zytokin-AK-Präzipitate kann die Anzahl der SFCs je Vertiefung unter dem Mikroskop ausgezählt werden und damit auf die Rate von spezifischen T_H-Zellen im peripheren Blut rückgeschlossen werden. Diese mikroskopische Auswertung kann auch apparativ, bspw. mittels eines Bioreaders® 5000 -E, erfolgen.

2.3.4 Analyse von B-Zellen im Rahmen der *A. fumigatus*-Immunantwort

2.3.4.1 Gewinnung von autologem Serum aus Spenderblut

Für die Analyse der B-Zellreaktion auf *A. fumigatus* wurde den bereits oben definierten Studienpopulationen Serum abgenommen. Als Bestandteil der humoralen Immunantwort befinden sich die Immunglobuline im Serum. Mit Vollblut befüllte Serum-Monovetten, die für diesen Zweck einen Gerinnungsaktivator enthalten, wurden bei 3000g für 7 Minuten zentrifugiert, sodass sich die Blutzellen absetzten und anschließend die sich oben befindliche Serumphase abgenommen werden konnte. Bis zur Verwendung wurde das aktivierte Serum bei -18°C eingefroren.

2.3.4.2 Western Blot

Um *Aspergillus*-AK im Serum nachzuweisen, wurde die Methode des Western Blots angewandt. Dazu wurde zunächst eine SDS-PAGE wie in 2.3.2.2 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, um später Antigen-spezifische AK detektieren zu können.

Ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld transferiert die Proteine in Richtung der Anode auf eine Membran. An dieser bleiben die Antigene durch hydrophobe Wechselwirkungen bei Nitrocellulose-Membranen bzw. durch polare Interaktionen bei PVDF-

(Polyvinylidenfluorid-) Membranen haften. Das SDS kann ausgewaschen werden, sodass die Proteine renaturieren können. Damit sind sie wieder befähigt, an Epitopen spezifische AK zu binden. Mit der Zugabe des jeweiligen Spenderserums binden die darin befindlichen AK an die getesteten *Aspergillus*-Antigene, unspezifisch gebundene AK werden aufgrund ihrer geringeren Bindungsaffinität in Waschschritten entfernt. Die Antigen-AK-Komplexe werden mit einem sekundären AK versetzt, der an das humane IgE bindet und mit alkalischer Phosphatase- Enzymfunktion ausgestattet ist, womit die spezifischen IgE-AK je Spender/-in quantitativ detektiert werden können [166, 170-172]. Nach der SDS-PAGE wurde die Nitrocellulose-Membran zusammen mit 2 Filterpapieren (Whatman-Papiere), 2 Schwämmchen und dem Gel in Trispuffer (5,82g Tris, 2,92g Glycin, 200mL Methanol, 800mL ddH₂O) eingeweicht. Nach Schema wurden sie in die Blotkammer geschichtet und bei 350mA für eine Stunde geblottet. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 Minuten in TBST (TBS, 0,01% Tween) geschwenkt, mit 1% BSA für eine Stunde inkubiert und mit Serum-BSA (1% BSA, 8mL Serum) über Nacht bei 4°C auf dem Schwenker stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Membran in TBST gewaschen und anschließend in *Goat Anti-Human IgE*-Alkalische Phosphatase geschwenkt. Nach 2 Stunden wurde die Membran erneut mit TBST und TBS gewaschen und mit Entwicklungspuffer versetzt. Die Farbreaktion wurde nach 2 Stunden mit destilliertem Wasser gestoppt. In **Abbildung 11** wird schematisch die IgE-Messung im Western Blot dargestellt.

Im Coomassie-Gel können die Proteine lokalisiert werden, im Western Blot zeigt sich, welcher Proband im Serum spezifische IgE-AK für die verwendeten Antigene und das Lysat besitzt, denn nur dann werden die Banden sichtbar. Die Bandenintensität gibt zugleich auch einen Hinweis auf das quantitative Vorkommen des spezifischen IgE-AKs je Spender/-in.

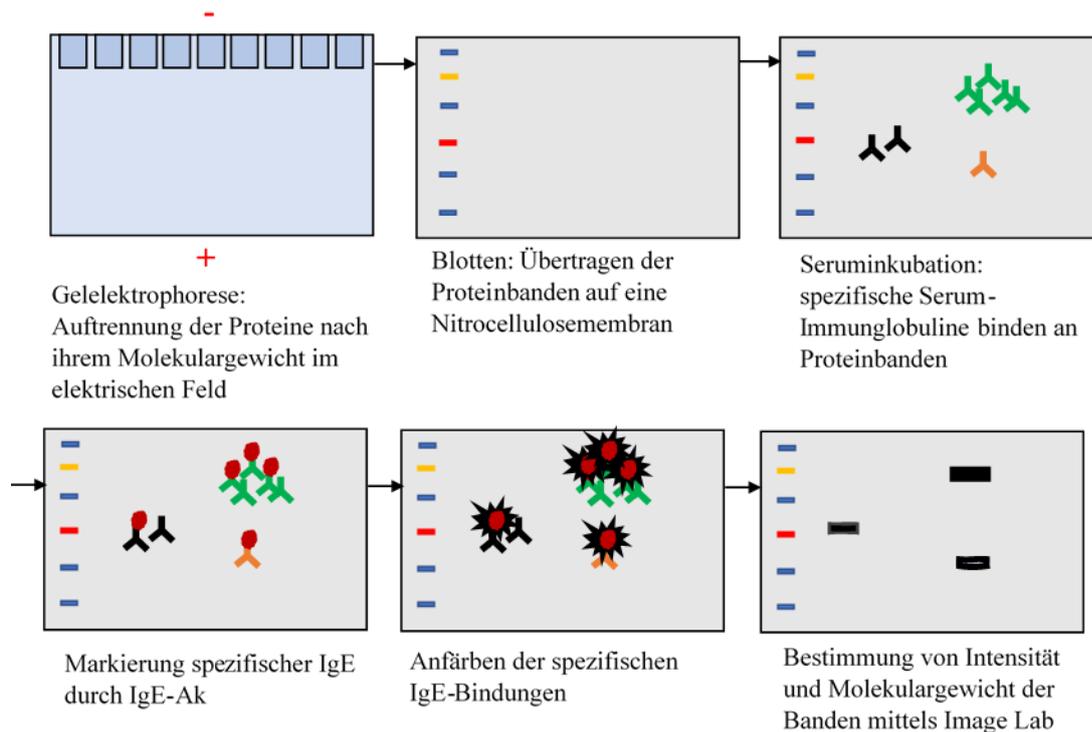


Abbildung 11: IgE-Messung im Western Blot: Die Antigene, für die eine spezifische IgE-Antwort ermittelt werden sollen, werden in einer SDS-PAGE aufs Gel gebracht und entsprechend ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld verteilt. Anschließend werden sie als Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Diese wird mit Serum inkubiert, sodass spezifische Serum-Immunglobuline an die Proteinbanden binden. Um nur IgE zu detektieren, werden diese durch IgE-AK markiert und die spezifischen IgE-Bindungen angefärbt. Die Intensität und Bandenstärke gibt Rückschluss auf die Anzahl der im Serum vorhandenen IgE, das Molekulargewicht dient zur Unterscheidung der verschiedenen Antigene.

2.3.4.3 IgE-Immuno-CAP-Test

Im klinischen Alltag ist momentan in der Allergiediagnostik die spezifische IgE-Messung Goldstandard. Dazu wird der Immuno-CAP-Test der Firma Thermo Fisher verwendet. Es handelt sich um einen Sandwich-ELISA. Ein Cellulosederivat bindet als feste Phase irreversibel das zu untersuchende Allergen. Spezifisches IgE in der Serumprobe bindet das Allergen, unspezifisches IgE wird abgewaschen. Mithilfe eines Zweitantikörpers gegen IgE, der Enzym-markiert ist, und einer Entwicklungsreagenz kann anhand der Höhe der Fluoreszenz auf die Menge des in der Probe vorhandenen spezifischen IgE geschlossen werden. Als hoch sensitiver Test werden bereits IgE-AK ab 0,1 kU_A/L in Spenderseren detektiert und eine weite Spanne bis 100 kU_A/L, bzw. mittels Verdünnungen sogar in noch höheren Bereichen reproduzierbar quantifiziert [173, 174].

Daher wurden Serumproben an die Laborpraxis synlab in Augsburg versandt, um diese Werte mit den Ergebnissen aus dem Western Blot vergleichen zu können. Es wurde das Gesamt-IgE der Probanden, spezifisches IgE für *A. fumigatus* (m3) sowie die spezifischen *Aspergillus*-Allergene Asp f1 (m218), Asp f3 (m220), Asp f4 (m221) und Asp f6 (m222) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Methodik zur Gewinnung von *Ascomycota*-Lysaten

Für die Etablierung von T-Zell-Versuchen und einem *A. fumigatus*-spezifischen IgE-Western-Blot, die zum Monitoring der Auswirkung von beruflicher chronischer *A. fumigatus*-Exposition herangezogen werden sollen, sind definierte Antigenpräparationen Voraussetzung. Kommerziell sind weder für *A. fumigatus* noch für die weiteren, wichtigsten bekannten allergenen Schimmelpilzspezies definiert hergestellte Lysate erhältlich.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher qualitativ hochwertige Lysate von *A. fumigatus* sowie *A. alternata*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* (als Vergleichsspezies in der Schimmelpilzdiagnostik) produziert werden. Für die Anwendbarkeit der Lysate in den folgenden Versuchsreihen ist eine Mindestkonzentration von 0,7mg/mL notwendig, um die Proben nicht zu stark zu verwässern und eine sinnvolle LPS-Bestimmung durchführen zu können.

3.1.1 Konidienanzucht auf Bierwürz-Agarplatten

Nach 3-tägiger Inkubation der Bierwürz-Agarplatten bei 25°C mit Konidien der jeweiligen *Ascomycota*, waren die Pilze (wie in **Abbildung 12** zu sehen) gewachsen und oberflächlich am Sporulieren. So konnten die Konidien geerntet, gezählt und zu Hyphen angezüchtet werden.

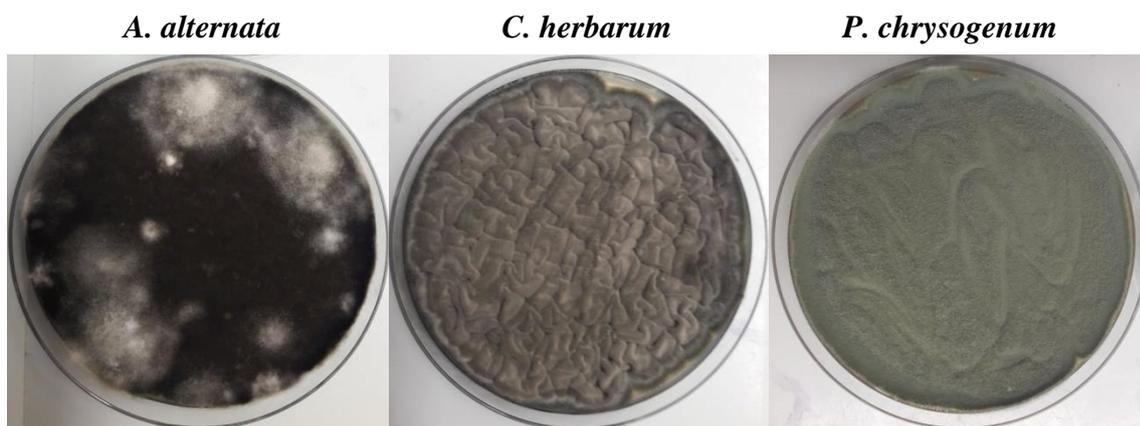


Abbildung 12: Morphologisches Aussehen der Ascomycota auf Bierwürz-Agarplatten. A. alternata, C. herbarum und P. chrysogenum wurden auf Bierwürz-Agarplatten für 3 Tage bei 25°C inkubiert, damit anschließend die Konidien geerntet und zu Lysat verarbeitet werden können.

3.1.2 Proteinkonzentration der Lysate

Für die Pilzspezies wurde bestimmt, nach welchem Zeitintervall die Proteinkonzentration nach *Bead Beating* am höchsten war. Es zeigte sich ein nahezu konstanter Proteingehalt des *A.*

fumigatus-, *A. alternata*- und *P. chrysogenum*-Hyphenlysats zwischen den Zeitpunkten 1 und 5 Minuten (siehe **Abbildung 13**).

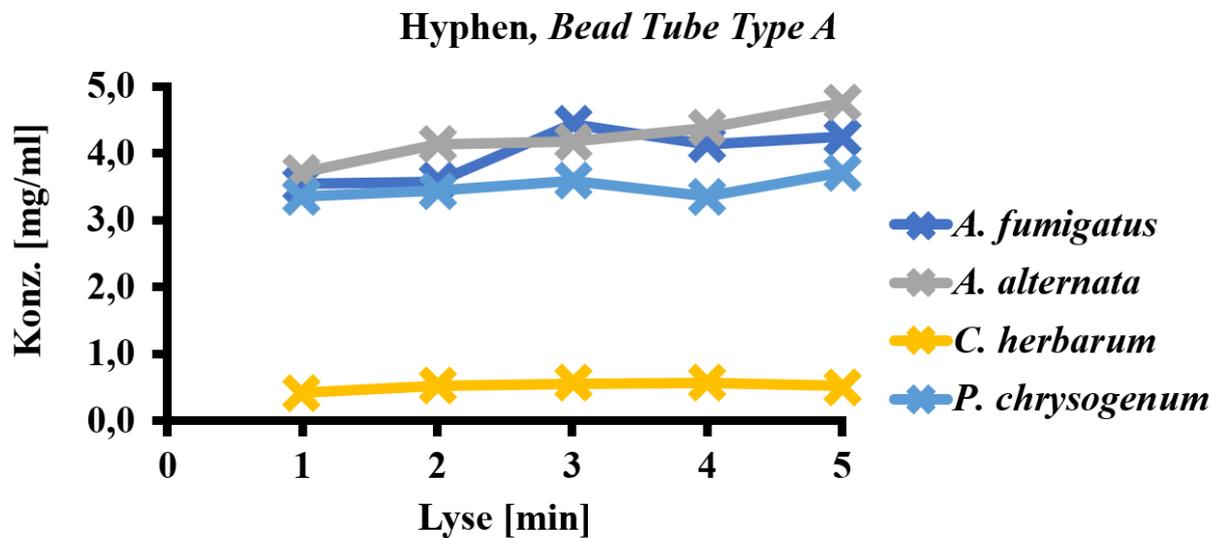


Abbildung 13: Proteinkonzentration im Zeitverlauf des Lysevorgangs je Pilz. Zur Herstellung des myzelialen Lysats wurden die zunächst vitalen Hyphen durch Keramik-Beads aufgespalten und der Proteingehalt nach jeder Minute Lysezeit gemessen, um den Zeitpunkt der höchsten Proteinkonzentration zu eruieren. Dieser Versuch wurde für *A. fumigatus*, *A. alternata*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* durchgeführt. Es wurden jeweils 245 mg vitale Hyphen in 350 μ L PBS eingesetzt.

Während der Lyse betrug die Konzentration für *A. alternata* 4,1 bis 4,8 mg/mL, *P. chrysogenum* blieb nahezu konstant bei 3,4 bis 3,7 mg/mL. Für *A. fumigatus* ließ sich ein Maximum nach 3 Minuten mit 4,4 mg/mL feststellen und für das *A. alternata*-Lysat wurde ein Zeitintervall von 2 Minuten festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Konzentration 4,14 mg/mL.

Da für *C. herbarum* die Proteinkonzentration innerhalb von 5 Minuten nur bei maximalen 0,56 mg/mL lag, wurden weitere größere Zeitintervalle analysiert (siehe **Abbildung 14**). Dabei wurde ein Maximum von 1,57 mg/mL zum Zeitpunkt von 60 Minuten identifiziert.

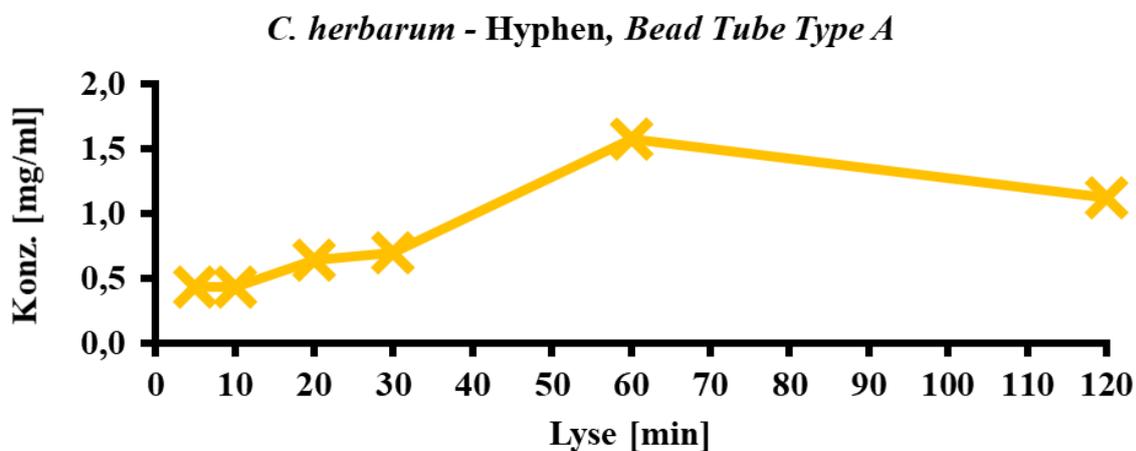
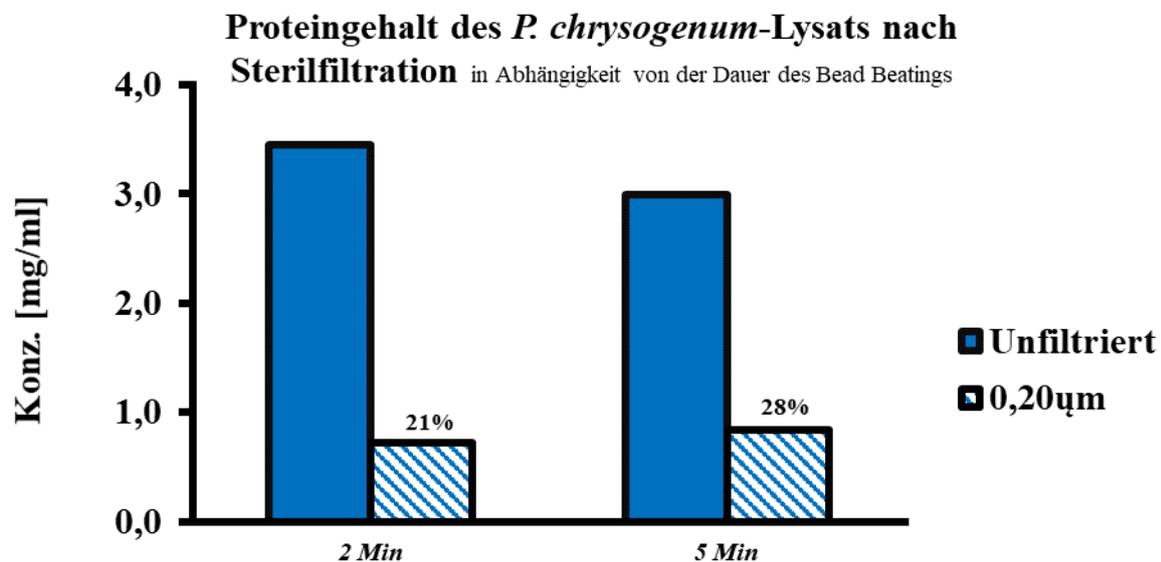


Abbildung 14: Proteinkonzentration im Zeitverlauf des Lysevorgangs für *C. herbarum*. Die zunächst vitalen *C. herbarum*-Hyphen wurden mittels Keramik-Beads gespalten und im zeitlichen Verlauf die Proteinkonzentration des Lysats gemessen. Maximale Konzentration nach 60 min. Es wurden 80 mg vitale Hyphen in 350 μ L PBS eingesetzt.

Als sinnvoll etablierten sich damit 2 Minuten für *A. alternata*, 3 Minuten für *A. fumigatus* und 5 Minuten für *P. chrysogenum*, sowie 60 Minuten für *C. herbarum*.

Um sicherzustellen, dass trotz Lyse keine Hyphen mehr vital sind, wurden die Lysate durch einen Spritzenvorsatzfilter der Porengröße 0,20 µm filtriert.

Um den Proteinverlust durch Sterilfiltration bei *P. chrysogenum* möglichst gering zu halten und einen ausreichenden Endproteingehalt im Lysat zu erhalten, wurde verglichen, inwiefern sich die Dauer des *Bead Beatings* auf die Proteinkonzentration nach Filtration mit 0,20 µm Spritzenvorsatzfilter auswirkt. Bei ähnlicher Proteinkonzentration des *P. chrysogenum*-Lysats nach 2 und 5 Minuten von 3,4 bzw. 3 mg/mL ließ sich der Verlust von 79% auf 72% senken (siehe **Abbildung 15**). So wurde in der weiteren Lysat-Produktion ein 5-Minuten-Intervall bevorzugt.



*Abbildung 15: Proteinkonzentration des Penicillium-Lysats vor und nach Filtration in Abhängigkeit von der Bead-Beating-Dauer. Die Proteinkonzentration des nach 2min Bead-Beating erhaltenen *P. chrysogenum*-Lysats reduziert sich durch Filtration mit 0,20 µm Spritzenvorsatzfilter auf 21%, das nach 5min Bead-Beating hergestellte Lysat vermindert sich nach Filtration mit 0,20 µm Spritzenvorsatzfilter auf 28%.*

Protein Assays vor und nach der Sterilfiltration ergaben für die weiteren Pilzspezies einen Verlust von 78 bzw. 80% für *A. alternata* bzw. *C. herbarum* (siehe **Abbildung 16**). Dennoch lag der Proteingehalt für *A. alternata* weiterhin über den erforderlichen 0,7 mg/mL. Für *C. herbarum* hingegen konnte mittels *Bead Beating* keine ausreichende Proteinendkonzentration erreicht werden. Bei *A. fumigatus* gingen durch Sterilfiltration nur 44% verloren, womit das Hyphenlysate auf 1,86 mg/mL konzentriert war.

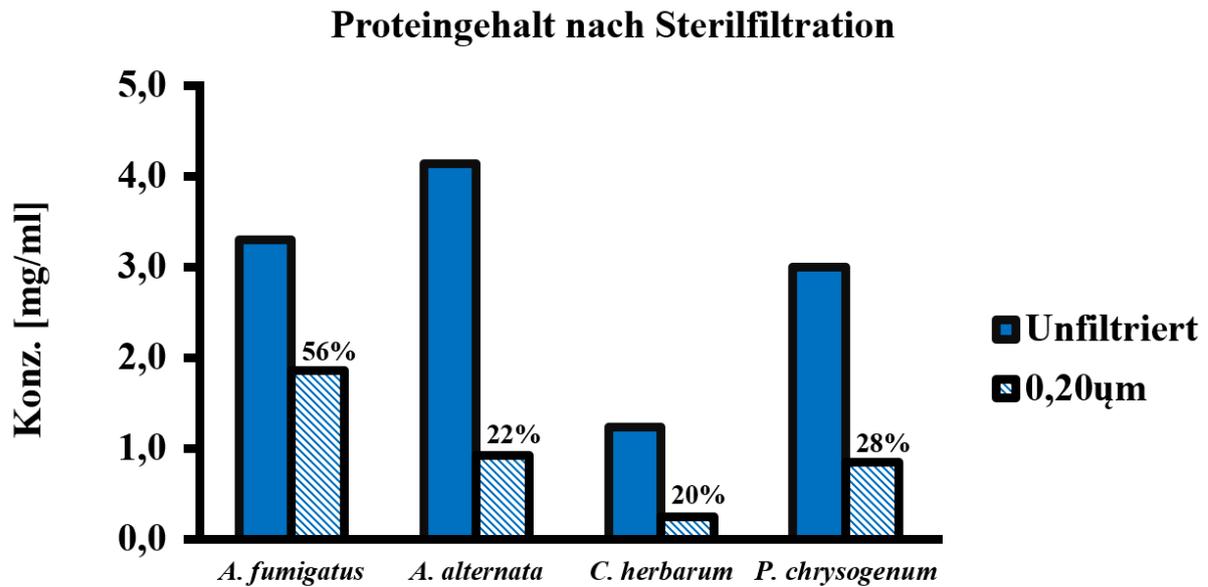


Abbildung 16: Vergleich der Proteinkonzentrationen der Ascomycota-Lysate vor und nach Filtration mit 0,20 µm Spritzenvorsatzfilter. Die Reduktion des Proteingehalts variiert je nach Pilzart. Für A. fumigatus beläuft sich die Konzentration nach Filtration noch auf 56%, für A. alternata sind es 22%, für C. herbarum 20% und für P. chrysogenum 28% des Ausgangsgehaltes.

Mit dem Ziel zu überprüfen, dass kein Pilzwachstum mehr stattfindet und die Lysate steril sind, wurden je 5 µL des jeweiligen Lysats auf Abklatschplatten ausgestrichen und bei 35°C inkubiert. Ein mögliches Pilzwachstum wurde über 5 Tage kontrolliert.

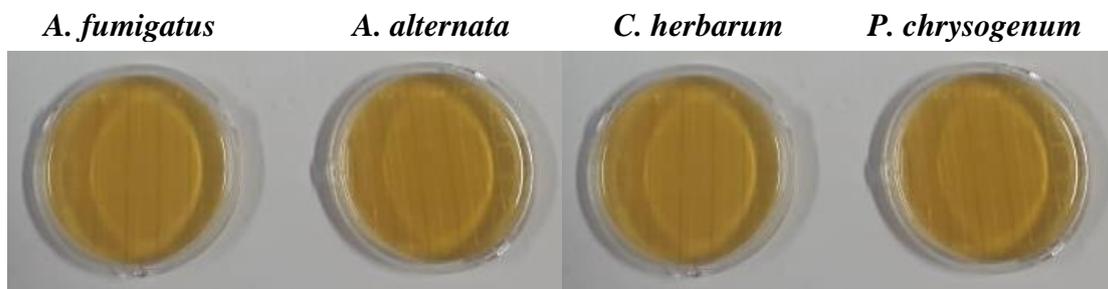


Abbildung 17: Vitalitätstest der sterilfiltrierten Hyphenlysate der Ascomycota auf Abklatschplatten. Je 5µL der Lysate von A. fumigatus, A. alternata, C. herbarum und P. chrysogenum wurden auf Abklatschplatten ausgestrichen und inkubiert. Es wurde kein Pilzwachstum nachgewiesen, sodass eine Vitalität der Hyphenlysate auszuschließen ist.

Wie in **Abbildung 17** dargestellt, waren die Proben steril und nicht vital.

3.1.3 Etablierung eines Protokolls für die Herstellung des *C. herbarum*-Hyphenlysats

Angesichts der geringen Biomasseproduktion von *C. herbarum* bei der Kondition 16 mL RPMI mit 1% Penicillin-Streptomycin, 4 mL FCS und 1×10^7 Konidien wurden alternative Wachstumsansätze mit je 1×10^7 Sporen ausgetestet:

- 16 mL H₂O + 4 mL FCS
- 16 mL PBS + 4 mL FCS
- 20 mL H₂O
- 20 mL PBS
- 16 mL HBSS + 4 mL FCS
- 16 mL RPMI + 4 mL FCS

- 20 mL HBSS

- 20 mL RPMI

Reines Wasser, PBS oder HBSS verzögerten das Wachstum, wohingegen reines RPMI, sowie jedes der 4 getesteten Medien in Kombination mit 20% FCS in etwa derselben Wachstumsgeschwindigkeit resultierten. Um dennoch mehr Biomasse zu produzieren, wurden die Sporen für 1 Woche bei 25°C und 200 RPM geschüttelt. Auf diese Weise wäre genügend Material für eine potenzielle Lysatproduktion vorhanden. Die weitere Lysatherstellung wurde nicht mehr durchgeführt, da (wie in Abschnitt 3.2.2 näher erläutert wird) im Verlauf ergebnisrelevante LPS-Verunreinigungen in den verwendeten Konidiensuspensionen und folglich auch in den hergestellten Lysaten festgestellt wurden.

3.2 Konzentration und Reinheit der spezifischen Antigene und Lysate

3.2.1 Proteinkonzentration der Antigene und Lysate

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand qualitativ hochwertiger Lysate und *A. fumigatus*-spezifischer Antigene der Effekt einer chronischen beruflichen *A. fumigatus*-Exposition untersucht werden. Von einem erweiterten Antigenespektrum im Vergleich zu Vorstudien, die oftmals auf 2-4 Antigene begrenzt waren [102, 175-177], erhofft man sich, ein Biomonitoring entwickeln zu können, welches chronische Exposition sichtbar macht. Die Antigene wurden dabei im Rahmen einer Kooperation mit der LMU München von der AG Ebel rekombinant hergestellt.

Für die Anwendbarkeit der Antigene in den folgenden Versuchsreihen ist eine Mindestkonzentration von 0,7mg/mL notwendig, um die Proben nicht zu stark zu verwässern und eine sinnvolle LPS-Bestimmung durchführen zu können.

In **Tabelle 3** werden die Antigene und Lysate aufgeführt, die als Stimulanzen für die Immunantwort eingesetzt werden sollten. Die mittels DC Protein Assay gemessenen Konzentrationen der verwendeten Antigene und Lysate lagen über der 0,7 mg/mL Grenze und waren daher prinzipiell geeignet.

Tabelle 3: Konzentrationen der verwendeten Antigene und Lysate: im DC Protein-Assay ermittelt

Lysat	Konzentration [mg/mL]
<i>A. fumigatus</i>	1,86
<i>A. alternata</i>	0,86
<i>P. chrysogenum</i>	0,91

Antigen		Konzentration [mg/mL]
Aspf1	sekretiertes Protein	3,10
Aspf3	zytosolisches Protein	1,30
Aspf4	sekretiertes Protein	2,90
Aspf6	zytosolisches Protein	1,70
Aspf8	zytosolisches Protein	1,20
Crfl	Zellwandprotein	2,10
Aspf22	zytosolisches Protein	2,40
CatB	Zellwandprotein	1,00
CipC	zytosolisches Protein	0,90
CsnB	sekretiertes Protein	2,72
Hämolysin	sekretiertes Protein	4,04
Pst2	Konidienprotein	2,04

3.2.2 Konzentration und Reinheit der Aspergillus-Antigene im SDS-PAGE

Coomassie

Mittels SDS-PAGE wurden die Antigene und das Lysat entsprechend ihrem Molekulargewicht als Banden auf das Gel aufgetragen und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Nahezu identische Balkenstärken bestätigen die korrekte Konzentrationsbestimmung im DC Protein Assay. Ebenfalls ist ersichtlich, dass es sich um reine Antigene handelt. Lediglich Aspf22 teilt sich auf 2 Banden auf und besteht demnach aus 2 Spleißvarianten. Das Coomassie-Gel, das anzeigt, wo sich das Antigen befindet, dient als Vorlage für die folgenden IgE-Western-Blots. Anhand der Aufteilung aller Banden im Coomassie-Gel sollen später die Banden im Western Blot den Antigenen zugeordnet werden. Banden im Western Blot entsprechen den spezifischen IgE-AK im Serum der Probanden/-innen gegen die getesteten *A. fumigatus*-Antigene. Um Serum zu sparen und zum Zweck der Übersichtlichkeit wurden mehrere Antigene mit deutlichem Unterschied im Molekulargewicht in eine *Lane* titriert, damit pro Spender/-in nur eine Membran im IgE-Western-Blot zu verwenden ist. Die in **Abbildung 18** gezeigte Aufteilung etablierte sich als sinnvoll, da alle Banden weit genug voneinander entfernt liegen, sodass eine Auswertung der einzelnen IgE-Bindungsstärken im Western Blot gewährleistet ist. Die Auswertung mit dem Programm *Image Lab 5.2* erlaubt eine Messung der Balkenstärke und eine Berechnung des Molekulargewichts der einzelnen Proteinbanden. Somit kann im Western Blot einerseits die prozentuelle IgE-

Bindungsstärke ermittelt werden und andererseits könnten im Lysat möglicherweise neue relevante Allergene entdeckt werden.

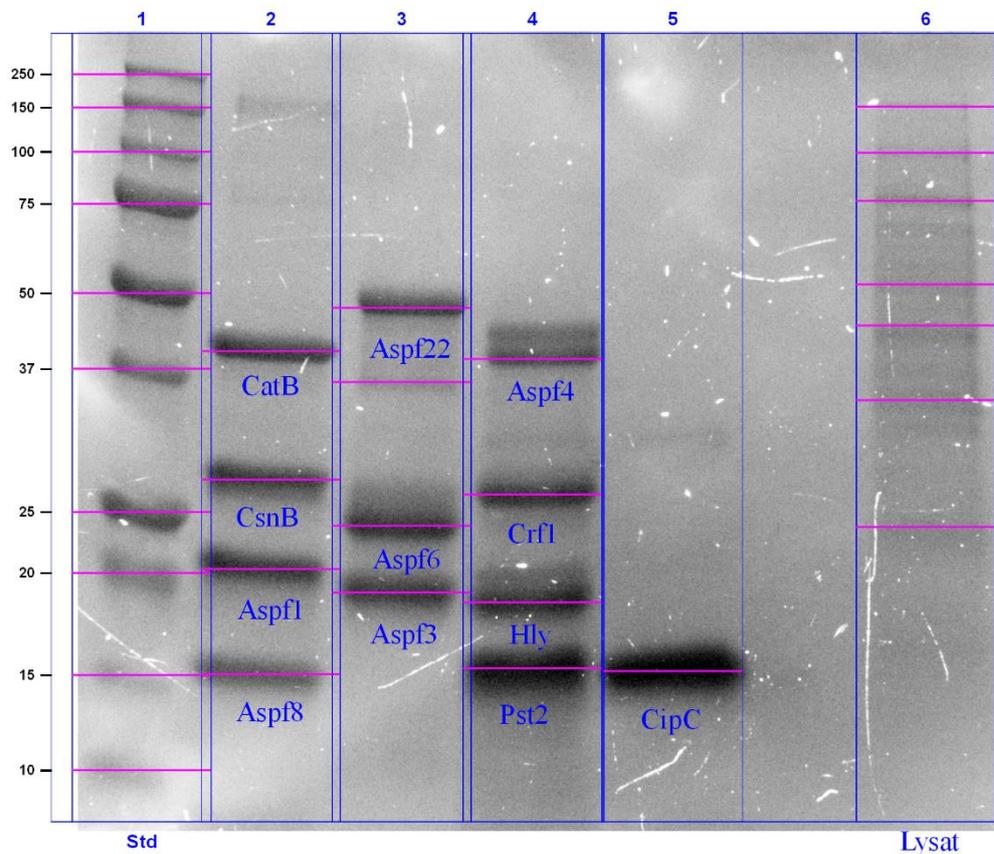


Abbildung 18: Coomassie-Gel für sichtbare Aufteilung der Antigene als Banden auf dem Gel in Hinblick auf die Western Blot-Analyse. Je 5 μ g Antigen und 7,5 μ g Lysat wurden aufgetragen, Standardkurve in Lane 1 für Bestimmung des Molekulargewichts in kDa.

3.3 PBMC-basierter ELISpot zur T-Zell-Analyse mithilfe der hergestellten Lysate und spezifischer *A. fumigatus*-Antigene

3.3.1 Einfluss der frühzeitigen Vorbereitung der ELISpot-Platten auf die Messergebnisse

Im Rahmen der Umsetzbarkeit der ELISpot-Analyse - möglicherweise später auch im klinischen Alltag - wurde untersucht, wie sich ein früheres Vorlegen der Stimulanzen auf die T-Zellreaktion auswirkt. In einem Vorversuch wurden die Medien, kostimulatorischen Faktoren und Antigenstimulanzen zu drei verschiedenen Zeitpunkten auf die ELISpot-Platten aufgetragen. Ziel der Analyse war festzustellen, ob die vorzeitige Bereitstellung der Analyseplatten Auswirkungen auf die Messergebnisse hat. Als Zeitpunkte wurden 15 Stunden und 2 Stunden vor Beginn der PBMC-Isolation gewählt und mit dem Referenzzeitpunkt, dem Ausplattieren während der Isolation, verglichen.

PBMCs von drei hochexponierten Probanden/-innen [42] wurden mit Crf1 und *A. fumigatus*-Lysat stimuliert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 19** dargestellt.

Zum Zeitpunkt 2h vor Ausplattierung liegen 13 von 18 Messungen im 95%-Konfidenzintervall. 15h vor Ausplattierung sind 9 von 18 Messungen, also 50%, innerhalb des CIs.

D3 weist zu jedem Messzeitpunkt einige Ausreißer auf, was die Analyse beeinträchtigt.

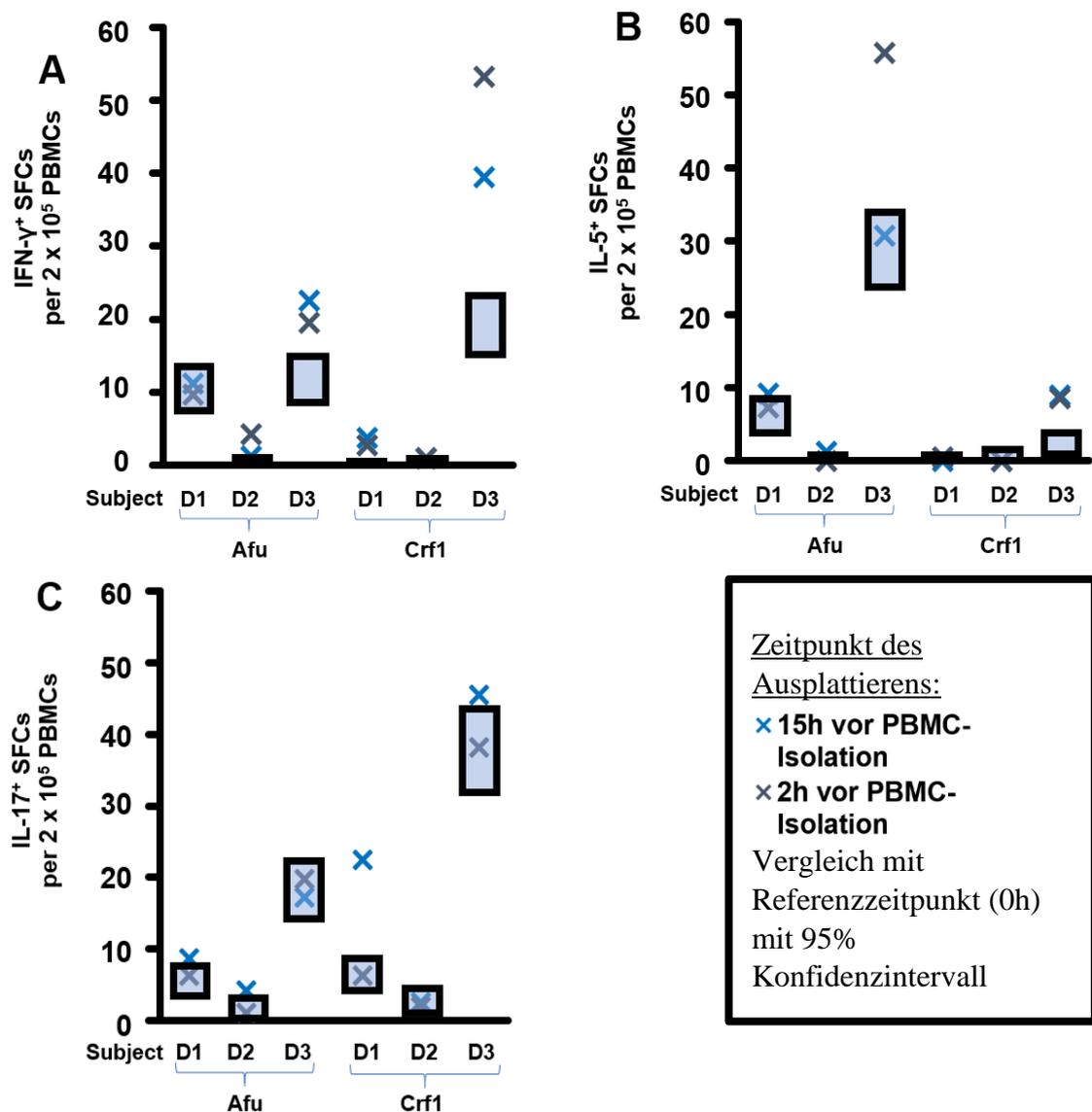


Abbildung 19: Einfluss des Zeitpunktes des Ausplattierens auf die Messergebnisse im ELISpot-Versuch für A) IFN- γ , B) IL-5 und C) IL-17A. D1, D2, D3 sind die drei verschiedenen hoch exponierten Spender/-innen. Afu-Lysat und Crf1 wurden als Stimuli verwendet. Als Referenzzeitpunkt wird die Rate der SFCs zum Zeitpunkt 0h, also direkt vor der Stimulation, gesetzt (schwarz, inclusive Konfidenzintervall). Das dunkelblaue Kreuz zeigt die Rate der SFCs zum Zeitpunkt 2h vor PBMC-Isolation, das türkise Kreuz die SFC-Rate 15h vor PBMC-Isolation.

So liegen lediglich 3 von 12 Messergebnissen im CI. Störfaktor sind Neutrophilen-Aggregate bei der PBMC-Isolation von D3. Es ist darauf zu achten, diese Aggregate nicht mit den PBMCs gemeinsam zu isolieren, aber dennoch ist dies fehleranfällig und der Spender/ die Spenderin D3 sollte deswegen ausgeschlossen werden. Berücksichtigt man daher nur die Werte von D1 und D2, liegen 2h vor Ausplattierung 10 von 12 Messungen im CI, zum Zeitpunkt 15h vor PBMC-Isolation sind 7 von 12 Werten im Vertrauensbereich.

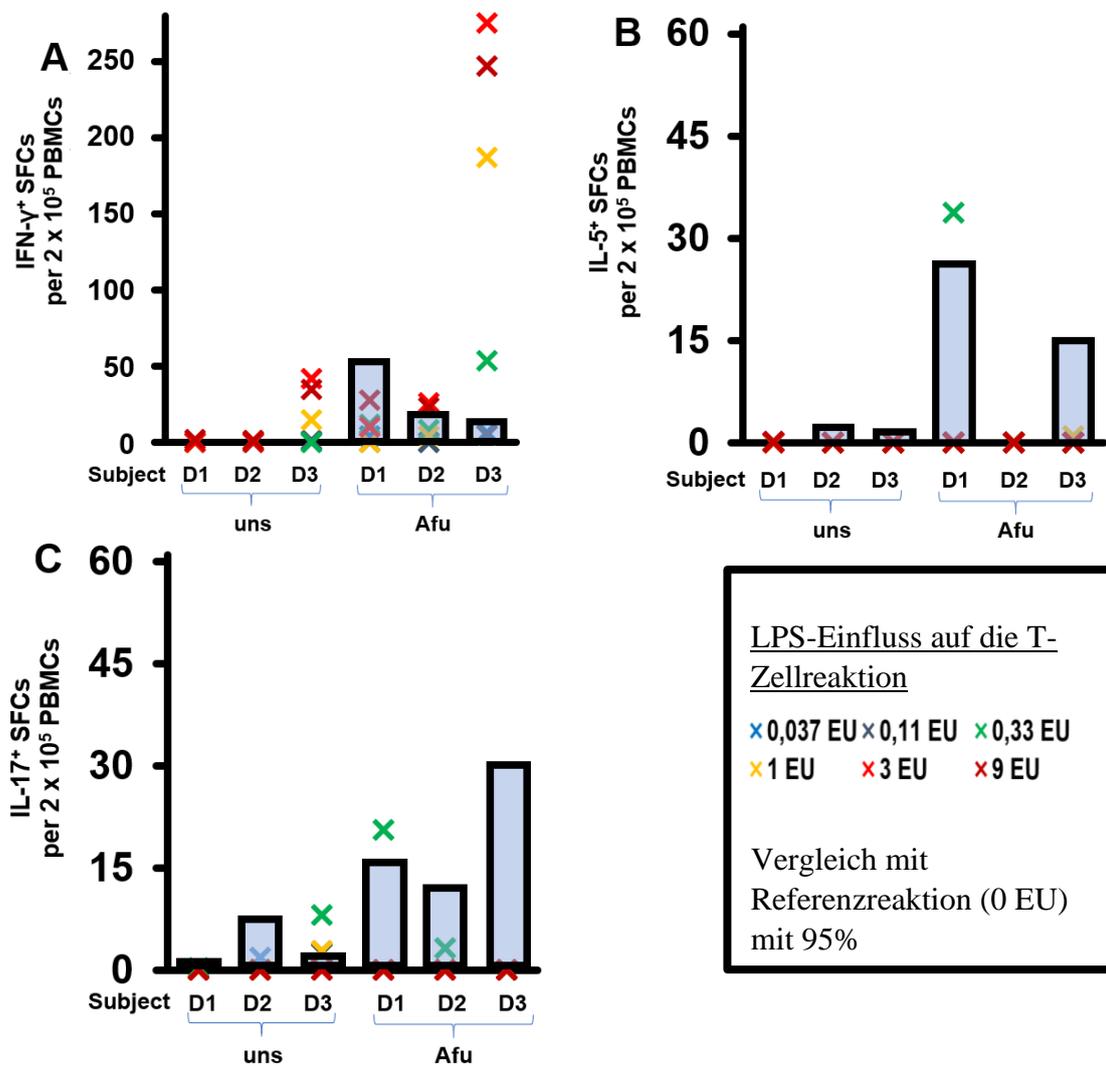
Auf Grundlage dieser Stichprobenergebnisse, die keine relevanten CI-Abweichungen für den Zeitpunkt 2h vor PBMC-Isolation zeigen, wurden bei allen nachfolgenden Versuchen die Stimulanzen 2h vor Blutentnahme angesetzt und ausplattiert. Das erleichtert die Durchführung des zeitlichen Versuchsablaufs.

3.3.2 Grenzwerte der LPS-Konzentrationen von Antigenen und Lysaten

Da LPS als Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien [39] über TLR4 und APZs T-Zellen vermehrt aktivieren kann und insbesondere die T_H1-Zelldifferenzierung triggert [40], wurde die LPS-Konzentration der verwendeten Antigene und Lysate bestimmt. Damit soll sichergestellt werden, dass nur die tatsächlich durch *A. fumigatus* stimulierten T_H-Zellen detektiert werden. Zum anderen wurde in einem Stufenexperiment ermittelt, ab welcher LPS-Konzentration sich die Werte im Vergleich zur unkontaminierten Probe verändern.

PBMCs von 3 hochexponierten Spendern/ Spenderinnen wurden isoliert und mit jeweils 3fach ansteigender LPS-Konzentration von 0,037 EU bis 9 EU inkubiert. 1mg LPS entspricht 2 Millionen EU [178]. Dabei waren je Spender/-in vier Ansätze pro LPS-Gehalt unstimuliert und 4 Ansätze mit Afu (*A. fumigatus*-Lysat aus Jena), das nachweislich keine LPS-Kontamination hat, stimuliert. Die IL-5-SFCs reagieren nicht sensibel auf LPS-Einfluss. 35 von 36 Werten liegen im Konfidenzintervall. Der einzelne Ausreißer (D1, Afu-stimuliert, 0,33 EU) relativiert sich insofern, als dass bei höheren LPS-Konzentrationen die Messergebnisse wieder innerhalb des CIs liegen (siehe **Abbildung 20**). Dagegen zeigen sich insbesondere für IFN- γ , aber auch für IL-17A erhöhte T-Zell-Aktivitäten bei steigender LPS-Konzentration. Die T-Zellevents bei 0 EU liegen für IFN- γ im Schnitt bei 1,3 SFCs im unstimulierten Ansatz und 49 SFCs im Lysat-

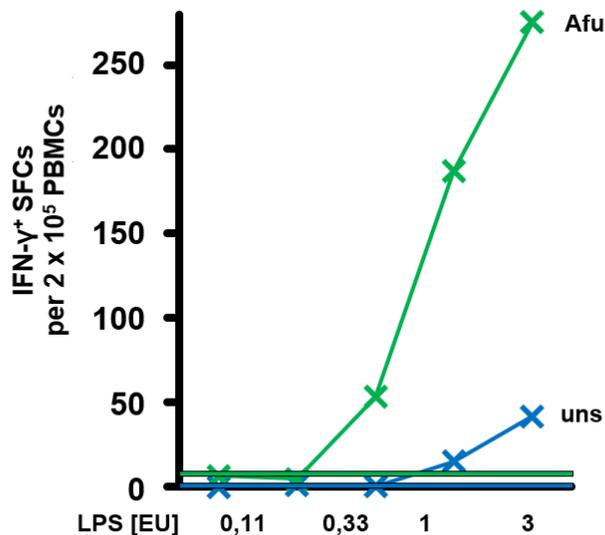
stimulierten Ansatz, hingegen wurden bei 9 EU im Schnitt 13,7 SFCs im unstimulierten Ansatz und 148 SFCs im Lysat-stimulierten Ansatz registriert.



*Abbildung 20: Auswirkungen von LPS auf die T-Zellantwort im IFN- γ - (A), IL-5-(B) und IL-17-ELISpot (C). Für die 3 Spender/-innen D1, D2 und D3 wurde jeweils die SFC-Rate im unstimulierten und einem mit *A. fumigatus*-Lysat stimulierten Ansatz bei LPS-freien Proben gemessen. Der graue Balken zeigt das CI an, das auf der LPS-freien Probe beruht. In jeweils 3-fach zunehmender Menge wurden die Ansätze zusätzlich mit LPS stimuliert, beginnend mit 0,037 EU bis 9 EU und die SFC-Rate ausgewertet.*

Über Spearmans Rangkorrelation ($R = 0,928571$) konnte eine signifikante Korrelation ($p = 0,002519$) von LPS-Gehalt und durchschnittlichen IFN- γ -positiven T-Zell-Events sowohl in den unstimulierten Proben als auch in den durch Lysat stimulierten Proben nachgewiesen werden. Allerdings sind Schwelle und Stärke des LPS-Einflusses interindividuell unterschiedlich. Insbesondere D3 reagiert auf LPS-Kontamination höchst sensitiv, wobei intraindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Art der Stimulation der T-Zellen bestehen.

Greift man nun D3 auf, der am sensitivsten auf LPS reagiert und damit maßgeblich anzeigt, ab wieviel EU eine Probenverfälschung durch LPS-Kontamination nicht ausgeschlossen ist, ergibt sich bei einem CI von 95% das in **Abbildung 21** dargestellte Resultat.



*Abbildung 21: LPS-abhängige T-Zellevents für den Spender/ die Spenderin D3. Die blaue bzw. grüne Querlinie gibt jeweils das obere CI (95%) an. Die blaue Kurve zeigt den unstimulierten Verlauf, die grüne Kurve den Verlauf bei Stimulation mit *A. fumigatus*-Lysat an bei jeweils steigender LPS-Konzentration. Es wurde in 3-fach steigender Konzentration LPS zugegeben (0,037 EU bis 3 EU).*

Auch bei 0 EU können in der unstimulierten Probe T-Zell-Events stattfinden, weshalb sich für D3 ein oberer CI-Grenzwert von 1,96 SFCs im unstimulierten IFN- γ -ELISpot ergibt, im Lysat-stimulierten Ansatz liegt der obere CI-Grenzwert bei 8,43 SFCs.

Bei der unstimulierten T-Zellfrequenz wird ab einer LPS-Kontamination von 1 EU ein mehr als 5-facher Wert im Bezug zum oberen Konfidenzintervall erreicht. Für die stimulierte Proben ist bei einer LPS-Konzentration von 0,33 EU bereits ein Anstieg der T-Zellevents auf mehr als das 6-fache zu verzeichnen.

Im Mann-Whitney-U-Test zeigt sich die größte LPS-Sensibilität im IFN- γ -ELISpot mit signifikanten Unterschieden zwischen der T-Zell-Reaktion bei 0 EU und 0,33 EU, 1 EU und 3 EU ($p = 0,0284$). Da bei der nächstniedrigeren getesteten Konzentration von 0,11 EU keine auffälligen Veränderungen der T-Zell-Aktivität zu notieren sind, wird diese als Grenzwert für die verwendeten Antigene und Lysate festgesetzt.

Im ELISpot wurden je 30 μ g/mL Antigen bzw. 50 μ g/mL Lysat eingesetzt, somit errechnet sich der Maximalwert aus der Division von 30 μ g/mL (bzw. 50 μ g/mL) durch die

Proteinkonzentration in mg/mL, sowie anschließender Multiplikation mit dem gemessenen LPS-Wert. Ist der Wert kleiner als 0,11 EU/mL, hat der LPS-Gehalt keine signifikante Auswirkung auf die T-Zellantwort im ELISpot.

Tabelle 4 zeigt die von der Lophius Sciences GmbH ermittelten LPS-Konzentrationen der für die Studie vorgesehenen Antigene und Lysate.

Tabelle 4: LPS-Gehalt der für die Studie vorhergesehenen Antigene und Lysate

Antigen	LPS-Gehalt [EU/mL]	LPS-Gehalt im ELISpot [EU/mL]	Lysat	LPS-Gehalt [EU/mL]
Aspf1	3,9533	0,03825774	<i>A. fumigatus</i>	53,37
Aspf3	< 1,0		<i>A. alternata</i>	> 100
Aspf4	< 1,0		<i>P. chrysogenum</i>	50,50/ 26,53
Aspf6	< 1,0		Afu (Jena)	< 1,0
Aspf8	< 1,0		Konidien	[EU/mL]
Crfl	< 1,0		<i>A. fumigatus</i>	63,16
Aspf22	< 1,0		<i>A. alternata</i>	28,44
CatB	< 1,0		<i>P. chrysogenum</i>	47,54
CipC	< 1,0		<i>C. herbarum</i>	41,49
CsnB	0,2281	0,00251581		
FG-gap	> 100			
Hämolyisin	1,5459	0,01147946		
Pst2	2,4	0,03529412		

Leider konnten die selbsthergestellten Lysate sowie das Antigen FG-gap nicht weiterverwendet werden, da ihr erhöhter LPS-Gehalt zu falsch positiven Ergebnissen im ELISpot führen könnte. So wurde Afu (Jena), dessen LPS-Gehalt nachgewiesenermaßen unter 1,0 EU/mL liegt, was aufgrund der Proteinkonzentration maximal 0,02 EU/mL im ELISpot bedeutet, in den folgenden Versuchen eingesetzt.

3.3.3 Vergleich der T-Zellantwort zwischen beruflich Schimmelpilz-Exponierten und der Kontrollgruppe

Mit dem Ziel, expositionsbedingte Unterschiede in der Immunreaktion auf *A. fumigatus*-spezifische Antigene zu detektieren, wurde das ELISpot-Verfahren eingesetzt. Nach Stimulation mit Afu-Lysat und 12 proteinogenen *A. fumigatus*-Antigenen wurden die Zellen, die T_H1 (IFN- γ), T_H2 (IL-5) und T_H17 (IL-17A) - Signaturzytokine sezernieren, hinsichtlich ihrer Frequenzen verglichen.

A. fumigatus- spezifische Immunantworten wurden unabhängig vom Grad der Exposition in gesunden Probanden/-innen auf ein breites Spektrum von Antigenen festgestellt. Im Vergleich der im Mittel gemessenen höchsten spezifischen T-Zellzahlen je Zytokin sind für IFN- γ und IL-17A jeweils AspF4 gefolgt von Crf1 führend. Die mittlere Frequenz beläuft sich dabei bei beruflich chronischer Exposition auf 0,023% (0,022%) und 0,017%, in der Kontrollkohorte auf 0,017% (0,015%) und 0,015% (0,013%). Für IL-5 hingegen sind AspF22, CatB und AspF3 - wenngleich auf niedrigerem Niveau - führend. Die Reaktion auf das Lysat ist bei IL-5 deutlich stärker als auf die einzelnen Antigene.

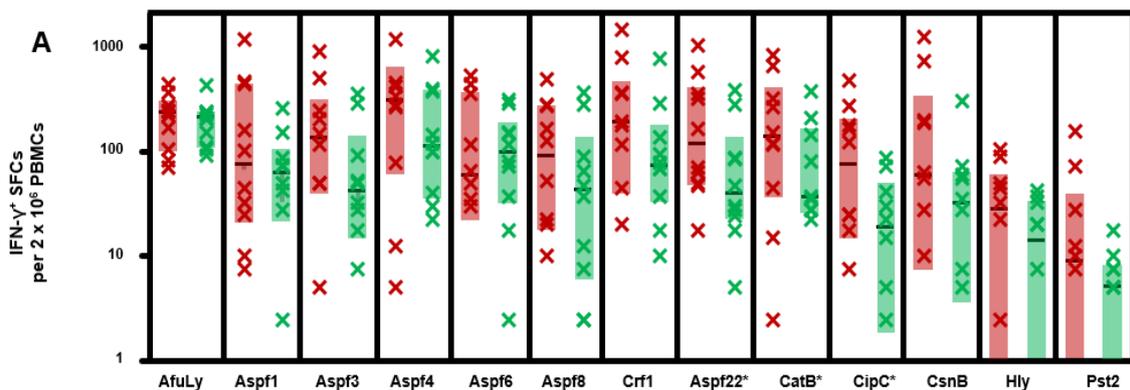
Insgesamt ist eine große Bandbreite der Reaktionen von Gesunden auf *Aspergillus*-Antigene festzustellen. Für Crf1 wurden pro 2×10^5 PBMCs Werte zwischen 0 und 144 (IFN- γ), 127 (IL-17) bzw. 39,25 (IL-5) gemessen. AspF4 imponiert mit Messungen bis 191 (IL-17), 152,5 (IFN- γ) bzw. 26,5 (IL-5). AspF22 zeigt unter IL-5 die höchste T-Zellreaktion mit bis zu 35 Events (127 für IL-17, 89,25 für IFN- γ) pro 2×10^5 PBMCs.

Am geringsten fällt die Reaktion auf Pst2 für T_H1- und T_H2-Zellen aus.

Auch wenn aufgrund der begrenzten Anzahl an Probanden/-innen keine statistische Signifikanz erreicht wird, induzieren 8 Antigene (AspF3, AspF4, AspF8, AspF9, AspF22, CatB, CipC und Hly) eine mindestens 2-fach höhere Anzahl an IFN- γ -SFCs und weitere acht Antigene (AspF1, AspF6, AspF8, AspF22, CatB, CipC, Hly und Pst2) eine mehr als 2-fach höhere Anzahl an IL-5-SFCs bei chronischer beruflicher Exposition im Vergleich zu Kontrollen. 5 Antigene (AspF8, AspF22, CatB, CipC und Hly) stimulieren damit überschneidend eine erhöhte T_H1- und T_H2-Zytokinsekretion. Für IL-17A zeigen sich expositionsabhängige Unterschiede, im Sinne einer mindestens 2-fach höheren Anzahl an SFCs, lediglich für Crf1 und CsnB. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf eine Co-Expansion von T_H1- und T_H2-Signaturzytokinen bei Gesunden mit chronischer beruflicher *A. fumigatus*-Exposition hin, wohingegen die T_H17-Antwort keine expositionsabhängige Veränderung aufzeigt.

3.3.3.1 IFN- γ -Antwort auf spezifische *A. fumigatus*-Antigene und Lysat

Die TH1-Antwort mit seinem Signaturzytokin IFN- γ ist bei *Aspergillus*-assoziierten Krankheiten für ihren protektiven Charakter bekannt. Auch wenn aufgrund der begrenzten Anzahl an Probanden/-innen keine statistische Signifikanz erreicht wird, induzieren zumindest 8 Antigene (Aspf3, Aspf4, Aspf8, Aspf9, Aspf22, CatB, CipC und Hly) bei den Biolandwirten/-innen im Vergleich zur Kontrollkohorte eine mindestens 2-fach höhere Anzahl an IFN- γ -SFCs (siehe **Abbildung 22**).



*Abbildung 22: PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte TH1- (IFN- γ) -Antworten auf *A. fumigatus*-Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte. PBMCs von 10 Biolandwirten/-innen (rot) und einer Kontrollgruppe von 10 nicht beruflich exponierten Probanden/-innen (grün) wurden mit *A. fumigatus*-Lysat (AfuLy) oder Proteinen stimuliert. Im ELISpot wurde die Anzahl der IFN- γ -produzierenden SFCs pro 1 Million PBMCs detektiert. Die individuellen Hintergrund-angepassten SFC-Zahlen, Mediane (schwarzer Balken) und der Interquartilbereich (farbige Boxen) sind dargestellt. Negative Messwerte (bei Probanden/-innen, deren SFC-Zahlen entweder 0 oder geringere SFC-Zahlen in den Antigen-stimulierten Proben als in der Messung des unspezifischen Hintergrunds ergaben) werden aufgrund des logarithmischen Maßstabs nicht dargestellt. Mit Stern (*) markiert sind die Antigene, die erfolgversprechend sind.*

Der Mann-Whitney-U-Test fällt für keine untersuchte Substanz statistisch signifikant aus. Womöglich wären Asp22 und CipC mit $p = 0,121$ bzw. $p = 0,103$ und CatB mit $p = 0,186$ bei größeren Stichproben in der Unterscheidung zwischen beruflich Exponierten und einer Kontrollgruppe hilfreich. Im Vulkandiagramm, das den relativen Median der 2 Kohorten mit nicht-parametrischer Signifikanztestung verknüpft, weisen Asp22, CipC und CatB entsprechend ebenfalls die beste Diskriminierungsfähigkeit zwischen chronischer beruflicher Exposition und Kontrollen auf. In der punktbiserialen Korrelation zeigen neben den 3 im Mann-Whitney-U-Test auffälligen *A. fumigatus*-Antigenen zusätzlich Aspf4, Aspf3 und Hly ein Median-zu-Median-Verhältnis > 2 und ein Signifikanzniveau von $0,05 < p < 0,2$ auf.

Entsprechend **Abbildung 23A** wird jedoch ersichtlich, dass eine hohe Schwankungsbreite in beiden Kohorten eine Differenzierung anhand eines dieser *A.*

fumigatus-Antigene mit Festlegung eines Grenzwerts schwierig macht. Der Median von Aspf22 liegt in der Gruppe der beruflich nicht Exponierten bei 19,375 pro 10^6 PBMCs und unter den beruflich Exponierten bei 58,75 pro 10^6 PBMCs, für CipC sind es 9,375 zu 36,875 pro 10^6 PBMCs. CatB weist einen Median von 8,125 zu 68,125 pro 10^6 PBMCs zwischen beruflich Nicht-Exponierten und Exponierten auf.

Möglicherweise wäre ein Ansatz, verschiedene Antigene zu kombinieren, um so besser auf die vorliegende Exposition schließen zu können. Kombiniert man die drei verschiedenen Antigene Aspf22, CatB und CipC, setzt als Grenzwert den Median der beruflich Exponierten und wertet als positiv nur diejenigen, die in mindestens 2 von 3 Werten \geq der Median sind, dann würden in vorliegender Studie 60% der beruflich Exponierten erkannt werden, 2 hochexponierte Probanden/-innen würden fälschlicherweise als beruflich Exponierte detektiert werden. **Abbildung 23B** stellt diese Überlegung dar.

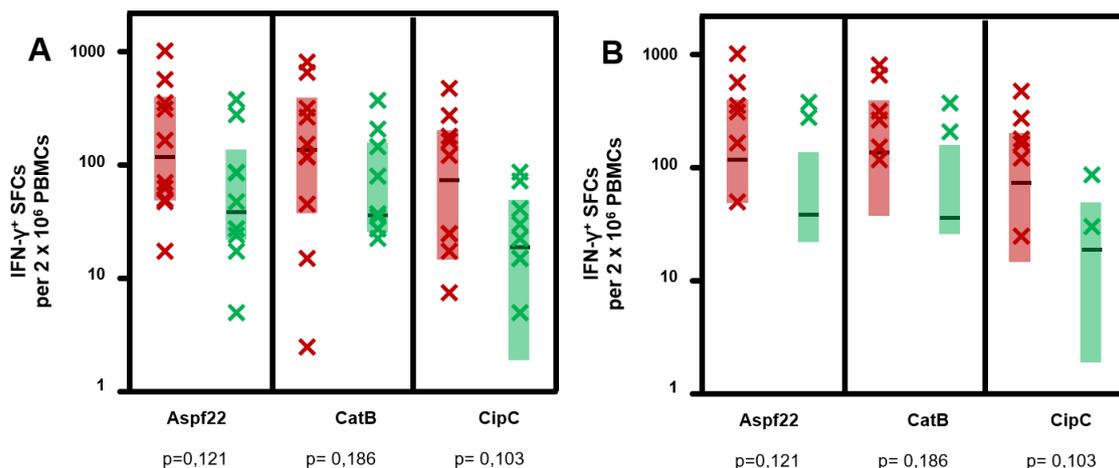


Abbildung 23: PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T_H1 - ($IFN-\gamma$) -Antworten auf *A. fumigatus*-Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte, Aspf 22, CatB und CipC mit höchstem Signifikanzniveau. **A)** PBMCs von 10 Biolandwirten/-innen (rot) und einer Kontrollgruppe von 10 nicht beruflich exponierten Probanden/-innen (grün) wurden mit Aspf22, CatB und CipC stimuliert. Im ELISpot wurde die Anzahl der $IFN-\gamma$ -produzierenden SFCs pro 1 Million PBMCs detektiert. Die individuellen Hintergrund-angepassten SFC-Zahlen und Mediane (schwarzer Balken), sowie die Interquartile sind dargestellt. Probanden, deren SFC-Zahlen < 1 sind oder geringere SFC-Zahlen in den Antigen-stimulierten Proben als in der Messung des unspezifischen Hintergrunds gemessen wurden, sind in der logarithmischen Skala nicht berücksichtigt. **B)** Berücksichtigung nur der Probanden/-innen, die mindestens in 2 der 3 verschiedenen Antigene SFC-Zahlen \geq dem jeweiligen Median der beruflich-Exponierten aufweisen.

Im Test entspräche dies einer Sensitivität von 60%, einer Spezifität von 80% und einem positiven prädiktiven Wert von 75%.

3.3.3.2 IL-5-Antwort auf spezifische *A. fumigatus*-Antigene und Lysat

Im Kontext von Allergien ist die IL-5-Reaktion von Interesse. Entsprechend zur TH1-Antwort induzieren acht Antigene (Aspf1, Aspf6, Aspf8, Aspf22, CatB, CipC, Hly und Pst2) bei chronischer beruflicher Exposition eine mehr als 2-fach höhere Anzahl an IL-5-SFCs im Vergleich zur Kontrollkohorte. Der Vergleich der IL-5-Antworten auf *A. fumigatus*-Antigene zwischen den beiden Studiengruppen ist in **Abbildung 24** dargestellt.

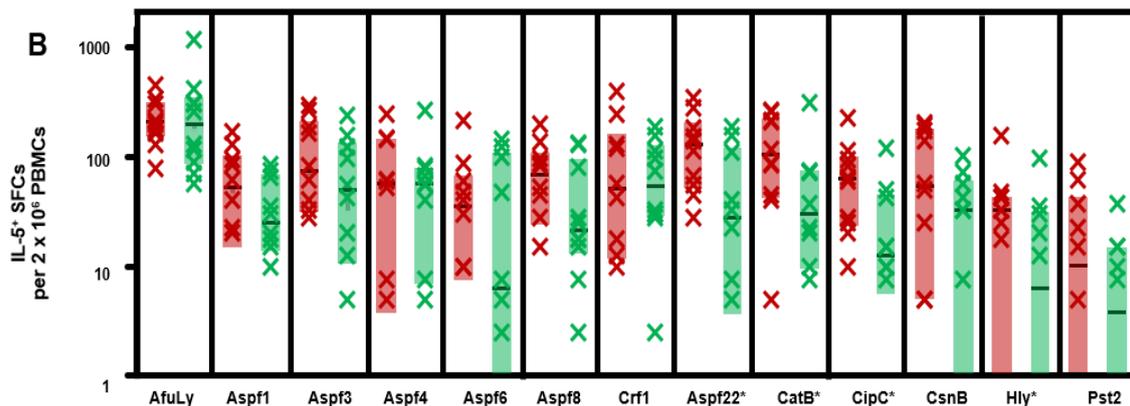


Abbildung 24: PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte TH2- (IL-5) -Antworten auf A. fumigatus-Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte. PBMCs von 10 Biolandwirten/-innen (rot) und einer Kontrollgruppe von 10 nicht beruflich exponierten Probanden/-innen (grün) wurden mit myzelialem A. fumigatus-Lysat (AfuLy) oder Proteinen stimuliert. Im ELISpot wurde die Anzahl der IFN- γ -produzierenden SFCs pro 1 Million PBMCs detektiert. Die individuellen Hintergrund-angepassten SFC-Zahlen, Mediane (schwarzer Balken) und der Interquartilbereich (farbige Boxen) sind dargestellt. Negative Messwerte (bei Probanden/-innen, deren SFC-Zahlen entweder 0 oder geringere SFC-Zahlen in den Antigen-stimulierten Proben als in der Messung des unspezifischen Hintergrunds ergaben) werden aufgrund des logarithmischen Maßstabs nicht dargestellt. 2-seitiger Mann-Whitney-U-Test mit Benjamini-Hochberg-Korrektur für eine FDR von 0,2. Der Stern () markiert sowohl signifikante Unterschiede zwischen Biolandwirten/-innen und nicht-beruflich exponierten Kontrollen ($p < 0,05$, $FDR < 0,2$) als auch Antigene mit Trend zur Signifikanz ($p < 0,05$, $FDR > 0,2$).*

Der Mann-Whitney-U-Test ist für Aspf22 und CipC statistisch signifikant ($p < 0,05$), auch unter Einbeziehung der Benjamini-Hochberg- Korrektur für eine FDR von 0,2. Für CatB mit einem Niveau von $p = 0,0539$ und Hly mit $p = 0,113$ zeigt sich ein positiver Trend. Damit zeigen sich wieder dieselben Antigene wie beim Zytokin IFN- γ (plus ggf. Hly) als möglicherweise hilfreich, um verschiedene *Aspergillus*-Expositionslevel zu unterscheiden. Im Vulkandiagramm, das den relativen Median der 2 Kohorten mit nicht-parametrischer Signifikanztestung verknüpft, weisen CipC, Aspf22, CatB und Hly entsprechend ebenfalls die beste Diskriminierungsfähigkeit zwischen chronischer beruflicher Exposition und Kontrollen auf. Die biseriale Korrelation ist für Aspf22 signifikant, ein Median-zu-Median-Verhältnis > 2 und ein Signifikanzniveau von $0,05 < p < 0,2$ weisen CipC, CatB und Aspf1 bei chronischer beruflicher Exposition auf.

In der Gruppe der beruflich Exponierten liegt der Median für Asp22 bei 63,75 pro 10^6 PBMCs mit einem Minimum von 22,5 bis zu einem Maximum von 175. Im Vergleich dazu ist der Median von Asp22 in der Kontrollgruppe bei 13,75 pro 10^6 PBMCs in einer Spannweite von 0 bis 95. Die **Abbildung 25A** veranschaulicht hierbei wieder die enormen Schwankungsbreiten innerhalb beider Gruppen.

Kombiniert man (analog zu $\text{INF-}\gamma$) die vier verschiedenen, meist versprechenden Antigene, setzt als Grenzwert den Median der beruflich Exponierten und wertet als positiv nur diejenigen, die in mindestens 2 von 4 Werten \geq der Median sind, dann würden in vorliegender Studie 70% der Biolandwirte/-innen erkannt werden, 2 nicht beruflich exponierte Probanden/-innen würden fälschlicherweise als beruflich Exponierte detektiert werden. **Abbildung 25B** stellt diese Überlegung dar.

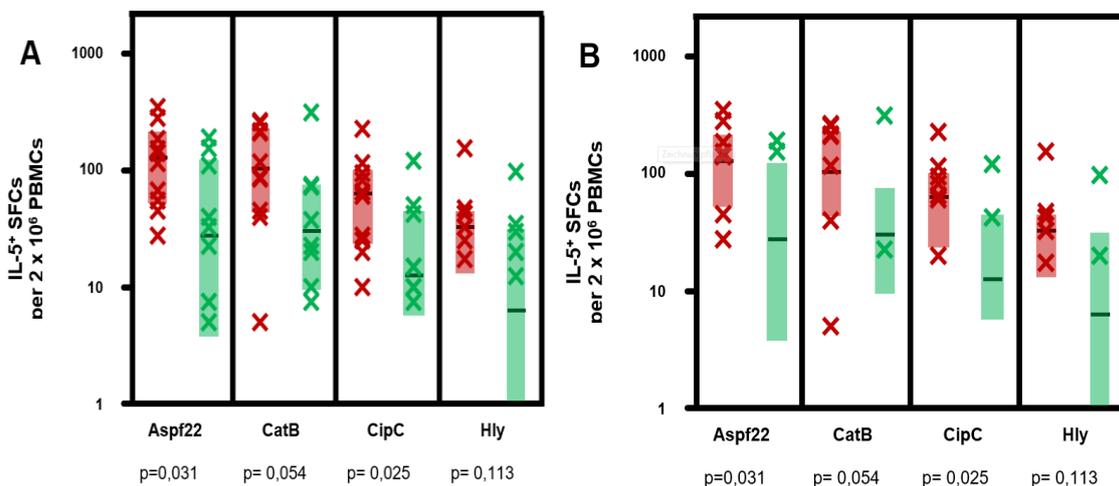


Abbildung 25: PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T_H2 - (IL-5) -Antworten auf *A. fumigatus*-Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte, Asp22, CatB, CipC und Hly mit höchstem Signifikanzniveau. **A)** PBMCs von 10 Biolandwirten/-innen (rot) und einer Kontrollgruppe von 10 nicht beruflich exponierten Probanden/-innen (grün) wurden mit Asp22, CatB und CipC stimuliert. Im ELISPOT wurde die Anzahl der $\text{INF-}\gamma$ -produzierenden SFCs pro 1 Million PBMCs detektiert. Die individuellen Hintergrund-angepassten SFC-Zahlen und Mediane (schwarzer Balken), sowie die Interquartile sind dargestellt. Probanden/-innen, deren SFC-Zahlen < 1 sind oder geringere SFC-Zahlen in den Antigen-stimulierten Proben als in der Messung des unspezifischen Hintergrunds gemessen wurden, sind in der logarithmischen Skala nicht berücksichtigt. **B)** Berücksichtigung nur der Probanden/-innen, die mindestens in 2 der 4 verschiedenen Antigene SFC-Zahlen \geq dem jeweiligen Median der beruflich Exponierten aufweisen.

Dies entspräche im Test einer Sensitivität von 70%, einer Spezifität von 80% und einem positiven prädiktiven Wert von 77,8%.

Im Zusammenspiel mit den Ergebnissen im $\text{INF-}\gamma$ -ELISpot für Asp22, CatB und CipC werden 9 der 10 beruflich Exponierten als solche erkannt. 3 von 10 nicht-beruflich Exponierten würden falsch positiv detektiert werden (siehe **Abbildung 26**).

IFN γ	Aspf22	58,75	190	12,08	140	42,5	8,75	15	43,75	13,75	23,75	2,5
	CatB	68,125	103,75	11,25	187,5	17,5	0	13,75	72,5	13,75	40	18,75
	CipC	36,875	15	20,416667	43,75	2,5	0	1,25	11,25	7,5	36,25	0
IL-5	Aspf22	63,75	11,25	3,75	95	55	2,5	16,25	20	0	77,5	0
	CatB	43,75	3,75	36,25	156,25	36,25	0	10	37,5	5	11,25	18,75
	CipC	31,25	3,75	25	21,25	7,5	5	5	7,5	0	60	0
	Hly	16,25	0	0	48,75	17,5	0	6,25	15	0	10	0
IFN γ	Aspf22	58,75	511,25	82,5	283,75	31,25	8,75	25	35	178,75	23,75	157,5
	CatB	68,125	410	133,75	330	60	1,25	76,25	7,5	58,75	22,5	158,75
	CipC	36,875	137,5	61,25	238,75	12,5	8,75	90	0	81,25	3,75	12,5
IL-5	Aspf22	63,75	92,5	57,5	76,25	22,5	13,75	27,5	141,25	70	33,75	175
	CatB	43,75	58,75	42,5	105	20	2,5	43,75	128,75	107,5	22,5	132,5
	CipC	31,25	10	12,5	57,5	47,5	41,25	13,75	32,5	112,5	5	30
	Hly	16,25	16,25	12,5	8,75	21,25	23,75	0	21,25	16,25	0	77,5

Abbildung 26: Wertetabelle für die relevantesten Allergene im Rahmen der Differenzierung zwischen beruflich Exponierten und nicht beruflich exponierten Probanden/-innen. gelb = high exposure, grün = low exposure, rot = beruflich exponiert. Die Werte \geq dem Median der beruflich Exponierten sind hervorgehoben. Sind mindestens 2 von 3 für IFN- γ bzw. 2 von 4 für IL-5 Werten \geq dem Median, ist der Proband/ die Probandin farblich hervorgehoben.

Demnach ergäbe sich eine Sensitivität von 90% bei einer Spezifität von 70%. Der negativ prädiktive Werte läge bei 87,5%. 75% der Probanden/-innen mit positivem Testergebnis wären tatsächlich einer chronischen beruflichen *A. fumigatus*-Exposition ausgesetzt.

3.3.3.3 IL-17A-Antwort auf spezifische *A. fumigatus*-Antigene und Lysat

Minimale Unterschiede in der IL-17-Antwort (siehe **Abbildung 27**) zwischen den beiden Kohorten können gezeigt werden, wobei lediglich Crf1 und CsnB eine mindestens 2-fach höhere Anzahl an IL-17-SFCs bei chronischer beruflicher Exposition induzieren.

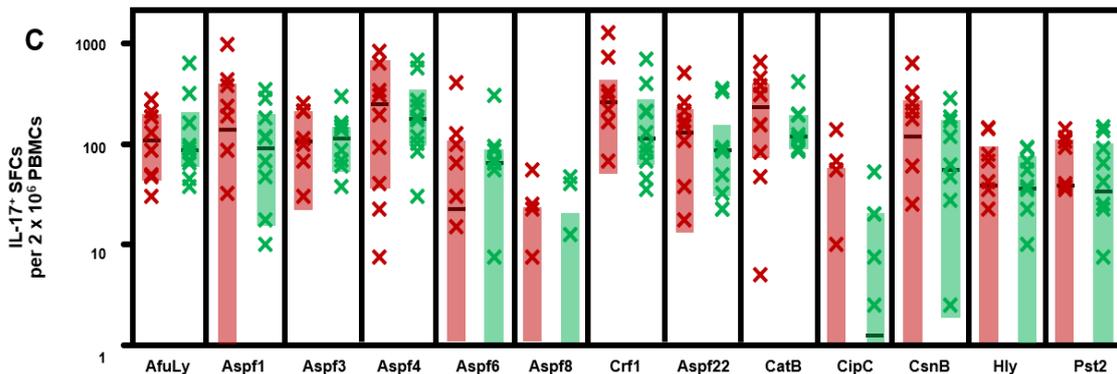


Abbildung 27: PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T_H17 - (IL-17A) -Antworten auf *A. fumigatus*-Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte. PBMCs von 10 Biolandwirten/-innen (rot) und einer Kontrollgruppe (grün) wurden mit myzelialem *A. fumigatus*-Lysat (AfuLy) oder Proteinen stimuliert. Im ELISPOT wurde die Anzahl der IFN- γ -produzierenden SFCs pro 1 Million PBMCs detektiert. Die individuellen Hintergrund-angepassten SFC-Zahlen, Mediane (schwarzer Balken) und der Interquartilbereich (farbige Boxen) sind dargestellt. Probanden/-innen, deren SFC-Zahlen < 1 sind oder geringere SFC-Zahlen in den Antigen-stimulierten Proben als in der Messung des unspezifischen Hintergrunds gemessen wurden, sind in der logarithmischen Skala nicht berücksichtigt.

Der Mann-Whitney-U-Test fällt für kein spezifisches *A. fumigatus*-Antigen oder Lysat statistisch signifikant aus, wobei auch keines erfolversprechende Tendenzen zeigt. Crf1 ist führend mit einem $p = 0,449$.

3.3.3.4 Expositionsabhängiger Vergleich des *A. fumigatus*-spezifischen IL5-/IFN- γ -Verhältnisses

Ein Indikator für eine sich entwickelnde Allergie könnte ein erhöhter Anteil von T_H2-Zellen sein [179]. Unter dieser Annahme wurde daher das Verhältnis von IL-5 zu IFN- γ zwischen den beruflich Exponierten und der Kontrollkohorte beleuchtet. Sorrenti et al. verwenden als Referenzbereich des T_H2-/T_H1-Verhältnisses 0,64935 bis zu 0,7519 [180]. Dieser trifft hier in Umrechnung auf die gesamte Studienpopulation zu (Mittelwert = 0,7158), auf Basis der Subpopulationen liegen die chronisch beruflich Exponierten unterhalb des Referenzbereiches (Mittelwert = 0,4215) und die Kontrollen oberhalb der angegebenen Spanne (Mittelwert = 0,9805).

In **Abbildung 28** wird für Aspf22, CatB und CipC das SFC-Verhältnis von IL-5 (T_H2-Signaturzytokin) zu IFN- γ (T_H1-Signaturzytokin) zwischen den beiden Versuchsgruppen verglichen, um expositionsabhängige Unterschiede zu identifizieren.

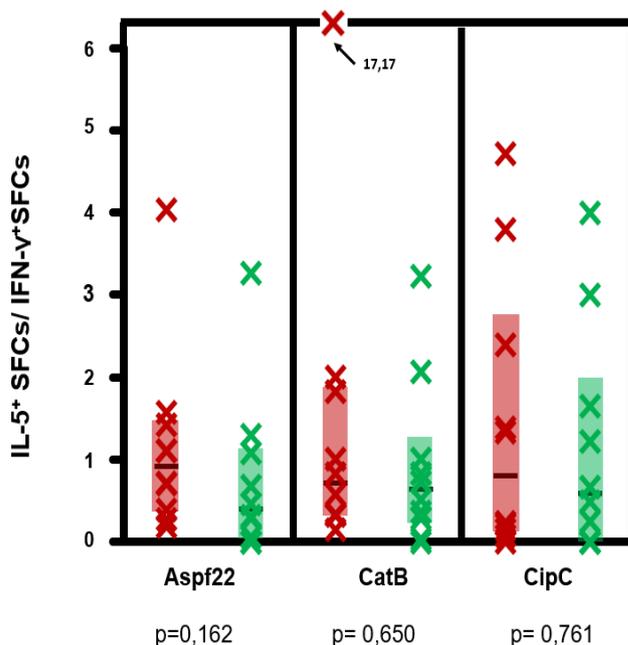


Abbildung 28: Verhältnis der T_H2-Antwort zur T_H1-Antwort mittels der Signaturzytokine IL-5 und IFN- γ anhand der bisher wegweisenden Antigene Aspf22, CatB und CipC. Beruflich exponierte Probanden/-innen mit roter Markierung, Kontrollgruppe mit grüner Markierung. Median als schwarzer Balken und jeweilige Interquartile sind dargestellt.

Lediglich für Aspf22 (nicht für CatB und CipC) zeigt sich ein positiver Trend mit $p = 0,162$ im Mann-Whitney-U-Test.

Während für die getesteten Antigene CatB, CipC, CsnB, Hly, Pst2 und Aspf22 in der Tendenz ein höheres T_H2 -/ T_H1 -Verhältnis bei chronischer beruflicher Exposition ermittelt wird, ergeben die als Allergene klassifizierten Antigene Aspf1/ 3/ 4/ 6/ 8 und Crf1 (mit Ausnahme von Aspf22) im Mittel und im Median (außer Aspf6) höhere T_H2 -/ T_H1 -Werte in der Kontrollkohorte. Am signifikantesten ($p = 0,111$) stellt sich dieser Zusammenhang für Crf1 dar (siehe **Abbildung 29**).

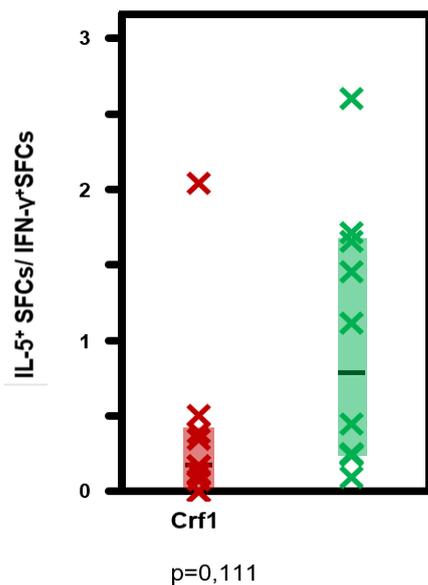


Abbildung 29: Verhältnis der T_H2 -Antwort zur T_H1 -Antwort für Crf1 mittels der Signaturzytokine IL-5 und IFN- γ . Beruflich exponierte Probanden/-innen mit roter Markierung, Kontrollgruppe mit grüner Markierung. Median als schwarzer Balken und jeweilige Interquartile sind dargestellt.

Die T_H2 -Polarisierung von Crf1 ergibt sich aufgrund der etwa 2,55-fachen T_H1 -Antwort der Biolandwirte/-innen (Median = 92,5 pro 10^6 PBMCs) zur Kontrollkohorte (Median = 36,25 pro 10^6 PBMCs). Die IL-5-Zytokinsekretion ist für Crf1 in beiden Gruppen nahezu gleich (Median = 25 pro 10^6 PBMCs bei chronischer beruflicher Exposition, Median = 26,875 pro 10^6 PBMCs in der Kontrollgruppe). Bei Aufschlüsselung der Kontrollkohorte in Niedrig- und Hochexponierte anhand des Lebensumfeldes ist das T_H2 -/ T_H1 -Verhältnis bei niedrig exponierten Probanden/-innen statistisch signifikant ($p = 0,0367$) erhöht. Der Median dieser Subgruppe liegt bei 1,658, was dem 9,7-fachen des Medians der beruflich Exponierten (Median = 0,170) entspricht. Im Vergleich der gesamten Kontrollkohorte (hohe und niedrige Exposition) mit den beruflich Exponierten ist noch der 4,6-fache Median (Median = 0,778) zu verzeichnen.

3.3.3.5 Expositionsabhängiger Vergleich des *A. fumigatus*-spezifischen IL17A- /IFN- γ -Quotienten

Als Trend lässt sich ein zugunsten von IFN- γ verschobenes Verhältnis bei chronischer beruflicher Exposition im Gegensatz zur Kontrollkohorte feststellen. Für Aspf22 ist dies mit $p = 0,028366$ im Mann-Whitney-U-Test statistisch signifikant. Weitere Antigene, die diese Relationen gut zeigen sind Aspf4 ($p = 0,140$) und Crf1 ($p = 0,153$).

Der Median für T_{H17}/T_{H1} -SFCs der beruflich Exponierten liegt mit 1,085 (Aspf4), 1,457 (Crf1) und 0,622 (Aspf22) um 22 bis 44 % niedriger als der Median der Kontrollgruppe (1,683 für Aspf4, 1,863 für Crf1 und 1,118 für Aspf22). Das IL-17-/IFN- γ -Verhältnis ist in **Abbildung 30** dargestellt. Bei den statistisch auffälligen Antigenen handelt es sich um Allergene.

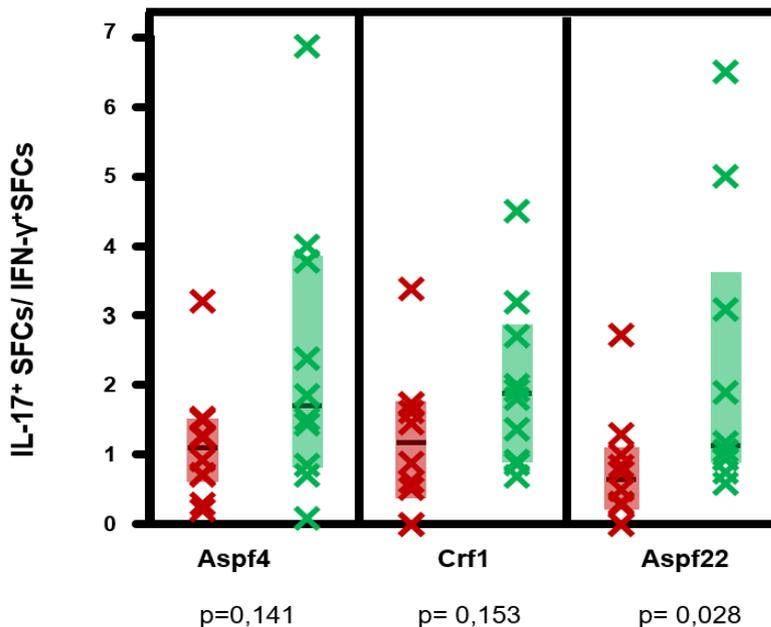


Abbildung 30: Verhältnis der T_{H17} -Antwort zur T_{H1} -Antwort mittels der Signaturzytokine IL-17A und IFN- γ anhand der statistisch relevantesten Antigene Aspf4, Crf1 und Aspf22 (p -Wert jeweils angegeben). Beruflich exponierte Probanden/-innen mit roter Markierung, Kontrollgruppe mit grüner Markierung. Median als schwarzer Balken und jeweilige Interquartile sind dargestellt.

3.4 B-Zell-Antwort auf *A. fumigatus*

Aspergillus-AK im Serum entsprechen der humoralen Immunreaktion auf *A. fumigatus*-Belastung und können über den Western Blot quantifiziert werden. Werden B-Zellen durch Proteinantigene aktiviert, differenzieren sie sich zu AK-produzierenden Plasma- und Gedächtniszellen [181, 182]. B-Zellen benötigen die Hilfe von T-Zellen, um auf

Proteinantigene adäquat reagieren zu können. Es kommt zum Klassenwechsel der schweren Ketten, verbesserter Affinität der Antigen-Bindungsstellen und langlebigen B-Zellen. Diese Form der B-Zellantwort dauert also im Vergleich zur T-Zell-unabhängigen Antwort auf multivalente Antigene wie Polysaccharide länger, ist im Gegenzug aber potenter.

Für Allergien wurde typischerweise ein vermehrter Klassenwechsel hin zu IgE-AK wahrgenommen [183]. Aus diesem Grund wurden im Western Blot *A. fumigatus*-spezifische IgE-AK detektiert.

3.4.1 Etablierung des Western Blot-Protokolls

Zunächst wurden die optimalen Bedingungen für den Versuch innerhalb der Studie etabliert.

Da bei der Verwendung von PVDF-Membranen ein starker Hintergrund zu sehen war (siehe **Abbildung 31**), wurden zur Lösung der Problematik Nitrocellulose-Membranen verwendet.

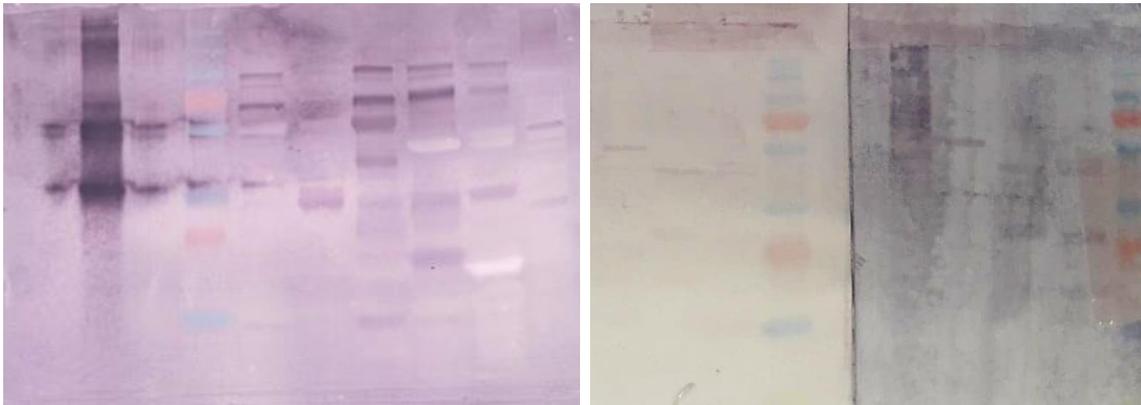


Abbildung 31: Vergleich von Nitrocellulose-Membran (links) und PVDF-Membran (mittig und rechts). Starker Hintergrund bei PVDF-Membran beeinträchtigt die Qualität der Ergebnisse.

Sowohl ein zu starker Hintergrund als auch eine zu starke Blockierung, sodass Serumantikörper nicht mehr binden können, muss verhindert werden. Ein Vergleich zwischen über Nacht bei 4°C blocken mit anschließender 2-stündiger Seruminkubation und 1 Stunde blocken mit anschließender Seruminkubation bei 4°C über Nacht ließ nur bei Variante 2 Banden detektieren (siehe **Abbildung 32**).



Abbildung 32: Vergleich von Blocken über Nacht bei 4°C (links) und Serumin Kubation über Nacht bei 4°C (rechts). Bänder nur bei kürzerer Blockierungszeit sichtbar. Eine zu starke Blockierung beeinträchtigt das Western-Blot-Ergebnis.

Für die Optimierung des Blockens, wurden 1% BSA mit 5% BSA verglichen und zugleich 4°C mit RT (siehe **Abbildung 33**). Es etablierte sich 1% BSA, da hier die Bande für AspF22 am deutlichsten sichtbar wurde. Vermutlich blockiert 5% BSA die Membran für die anschließende Inkubation mit Serum-Immunglobulinen zu stark.

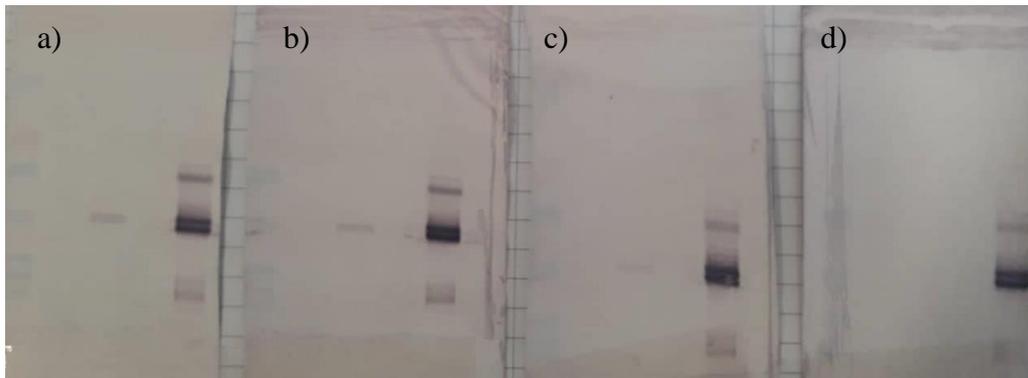


Abbildung 33: Vergleich verschiedener Konditionen für die Blockierung mit BSA:

a) 1% BSA bei 4°C, b) 1% BSA bei RT, c) 5% BSA bei 4°C, d) 5% BSA bei RT. 5%-BSA-Blockade beeinträchtigt das Western-Blot-Ergebnis.

Da im Rahmen dieser Studie, die chronische berufliche Exposition detektieren und ggf. Rückschlüsse auf Hypersensibilitätserkrankungen treffen möchte, die Messung von IgE-AK sinnvoll ist, wurde nun der AP-markierte AK IgG gegen IgE ausgetauscht. Da im Blut der Normbereich für IgG bei 8000 bis 15000 µg/mL liegt, für IgE aber nur bei <0,4 µg/mL [184], wurde die Serummenge erhöht. Statt 400 µL Serum wurden nun 2 mL Serum verwendet. **Abbildung 34** zeigt das ermittelte IgE-Profil gegen *A. fumigatus* von zwei hochexponierten Blutspendern/-innen.

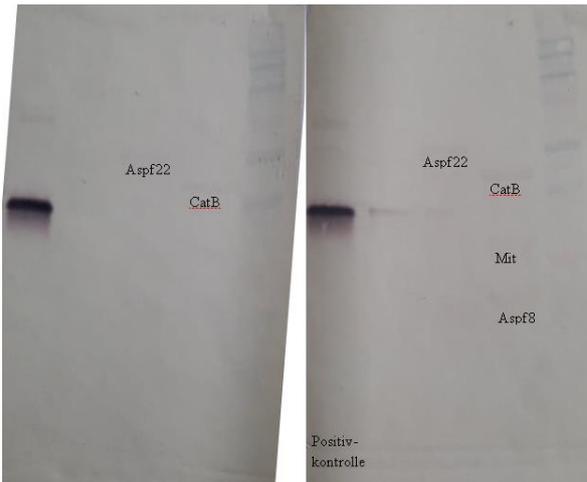


Abbildung 34: IgE-Western Blot von 2 hochexponierten Blutspendern/-innen. Einzelne Banden detektierbar.

Beim anschließenden Vergleich der Inkubation mit 2, 4 und 8mL Serum desselben Spenders ließen sich bei der Verwendung von 8mL Serum die Banden, hier insbesondere die Positivkontrolle (Protein G), besser detektieren (siehe **Abbildung 35**). Serummenge und Bandenstärke sind korrelierend.

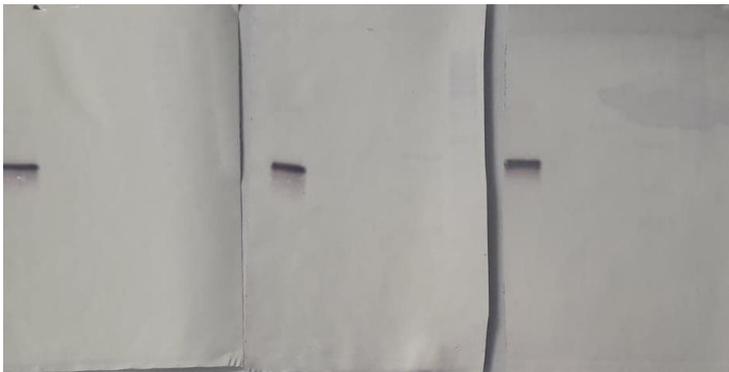


Abbildung 35: Optimale Menge des zu verwendenden Serums: Vergleich der Banden bei der Verwendung von 2, 4 und 8 mL Serum (von links nach rechts) desselben Spenders/ derselben Spenderin. Je mehr Serum verwendet wird, desto intensiver und besser detektierbar die Banden.

Zuletzt wurde die verwendete Antigenkonzentration überprüft. So wurden 5 μg Antigen mit 1 μg Antigen verglichen (siehe **Abbildung 36**).

Grund für diesen Versuch war die Annahme, dass möglicherweise intensivere Banden entstehen, wenn eine geringere Menge an Proteinbindungsstellen zur Verfügung stehen und damit dichter gebunden wird. Bei einer Sättigungskinetik wäre dies jedoch problematisch. Lysat (7,5 μg), Positivkontrolle und Standardkurve blieben unverändert. Der Test wurde jeweils bei zwei hochexponierten Blutspendern/-innen durchgeführt.

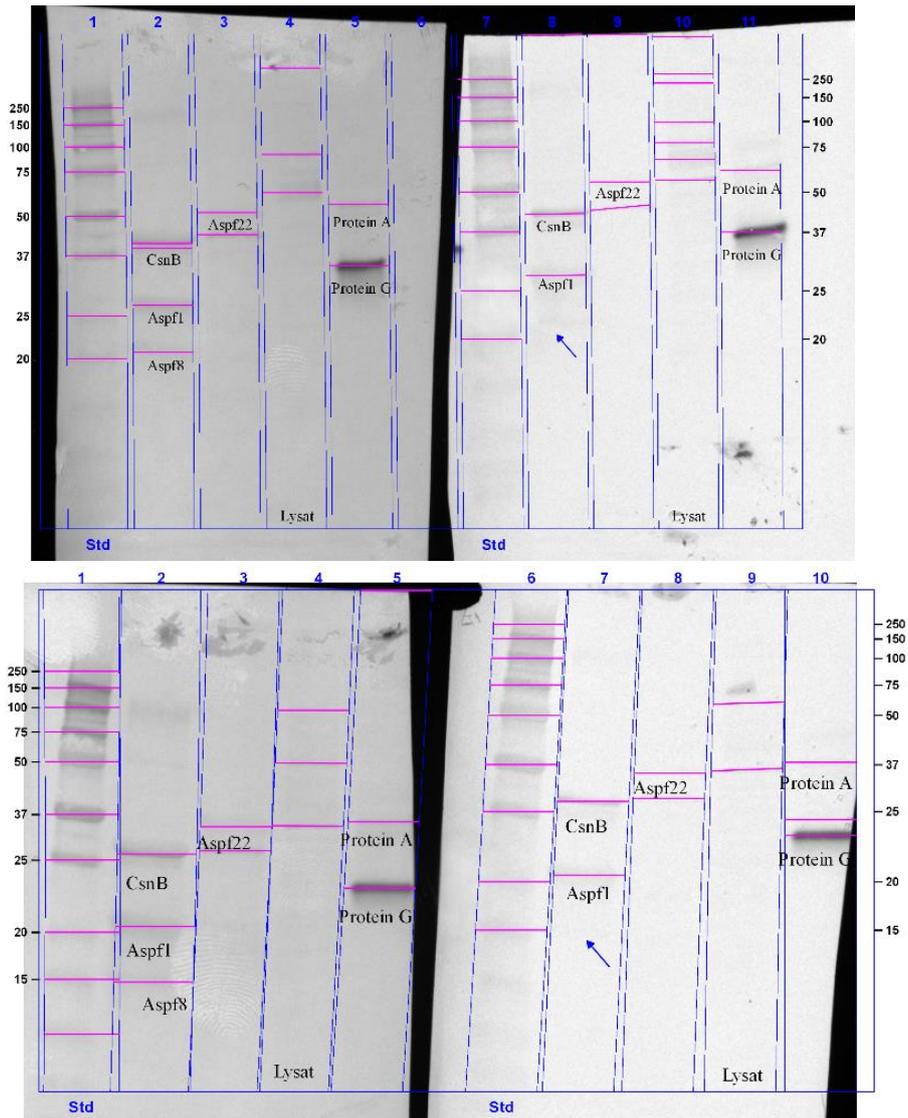


Abbildung 36: Vergleich der Banden bei 5 µg (je Spender/-in links) bzw. 1 µg Antigen (je Spender/-in rechts) anhand der Seren von 2 hochexponierten Blutspendern/-innen. Lysat (7,5 µg), Standard und Positivkontrolle identisch in allen 4 Blots. Pfeil als Hinweis für die fehlende Aspf8-Bande bei 1 µg Antigen.

Aufgrund der fehlenden Aspf8-Bande bei 1 µg Antigen in beiden Spendern/-innen und der Auswertung mittels Image Lab ®, wurde im Folgenden weiterhin 5 µg Antigen verwendet.

3.4.2 Expositionsabhängiger Vergleich der IgE-AK-Profile im Western Blot

Serumproben von gesunden Probanden/-innen und beruflich Schimmelpilz-exponierten Spendern/-innen wurden auf ihr IgE-AK-Profil gegen *A. fumigatus*-Antigene und ein Afu-Lysat untersucht.

Protein A und G wurden als Positivkontrolle verwendet. Protein A bindet hoch affin humane Serumantikörper und zeigt damit, dass in der Probe IgE-Antikörper vorhanden

sind. Seine Bande liegt bei 42kDa. Protein G kann als Bande bei 20kDa detektiert werden, sofern die Proteine erfolgreich auf die Membran transferiert wurden [185].

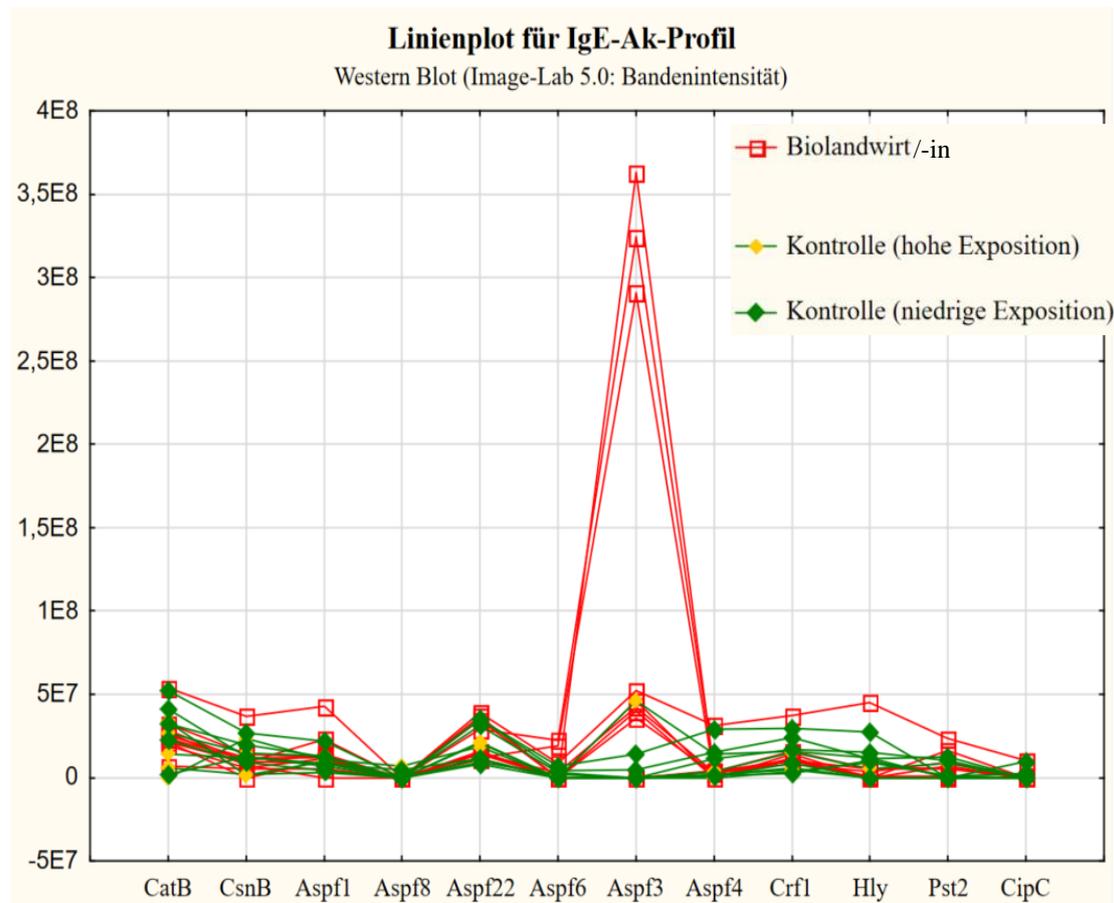


Abbildung 37: IgE-AK-Profil für A. fumigatus-spezifische Antigene bei Biolandwirten/-innen und Kontrollen. Anhand der im Image Lab 5.0 gemessenen Bandenintensitäten der im Western Blot detektierten Banden wurden IgE-AK-Profile erstellt. Rote Linien und Markierungen für beruflich exponierte Probanden/-innen, grüne Linien für Kontrollen (gelbe Markierung = hohe Umweltexposition; grüne Markierung = niedrige Umweltexposition).

Aspf3 erweist sich im Mann-Whitney-U-Test als signifikant ($p = 0,024$). In **Abbildung 37** sind die IgE-AK-Profile für die getesteten Antigene dargestellt, wobei ein deutlicher Ausschlag bei einigen Biolandwirten/-innen in Bezug auf Asp3 erkennbar ist. Für Asp3 konnte bei 8/11 beruflich Exponierten eine Bande nachgewiesen werden, wohingegen nur bei 3/10 der Kontrollen eine Bande detektiert wurde.

In **Abbildung 38** ist noch einmal das IgE-AK-Profil der Probanden/-innen dargestellt, allerdings ohne das Antigen Asp3, damit die niedrigeren Intensitäten der anderen spezifischen IgE-Nachweise differenzierter zu betrachten sind. Insgesamt zeigt sich (mit Ausnahme von Asp3) ein sehr heterogenes Bild. Für alle Probanden/-innen können IgE-AK gegen Asp22, der *A. fumigatus*-Enolase, und Crf1, einem Zellwandprotein, nachgewiesen werden.

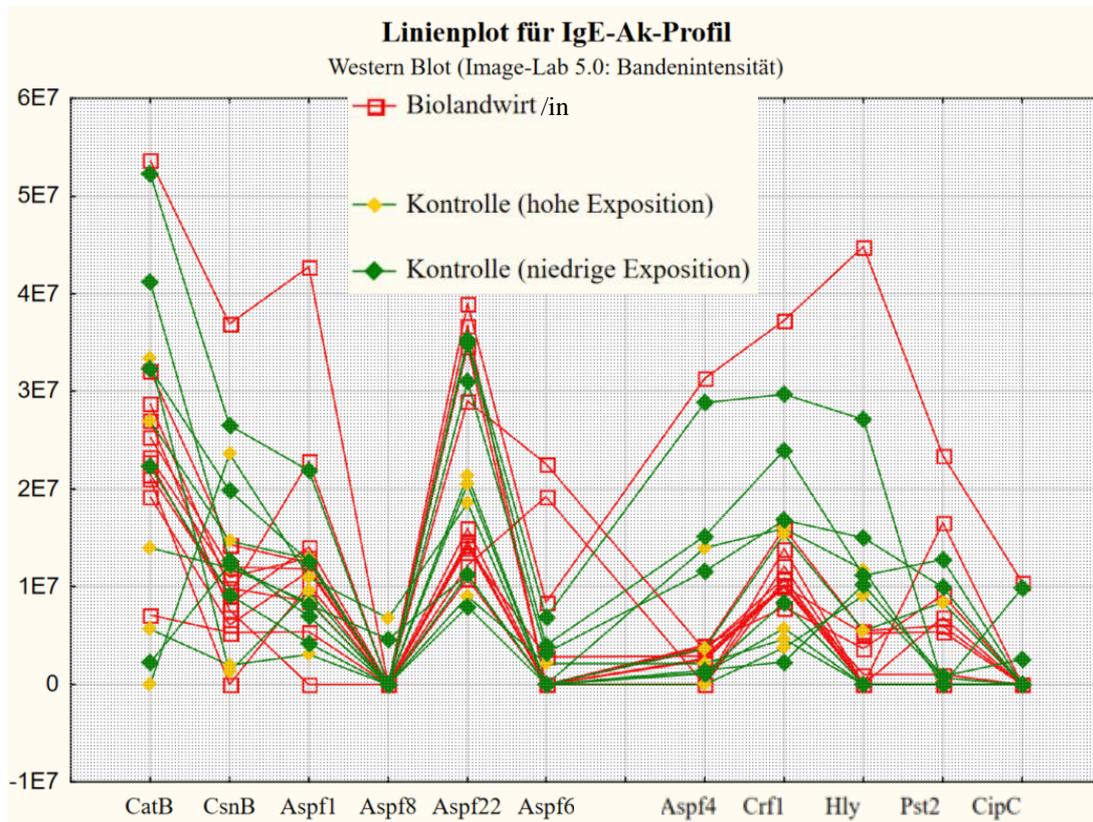


Abbildung 38: IgE-AK-Profil für A. fumigatus-spezifische Antigene bei Biolandwirten/-innen und Kontrollen. Siehe Abbildung 37, allerdings ohne das statistisch signifikante Asp3. Anhand der im Image Lab 5.0 gemessenen Bandenintensitäten der im Western Blot detektierten Banden wurden IgE-AK-Profile erstellt. Rote Linien und Markierungen für beruflich exponierte Probanden/-innen, grüne Linien für Kontrollen (gelbe Markierung = hohe Umweltexposition; grüne Markierung = niedrige Umweltexposition).

Die Auswertung vergleichender Daten für die IgE-Reaktion auf das myzeliale *A. fumigatus*-Lysat war nicht möglich, da die Auftrennung nach dem Molekulargewicht in der Gelelektrophorese zu ungenau war. Damit war es auch nicht denkbar, das Lysat nach den wichtigsten Allergenen aufzuschlüsseln oder gegebenenfalls sogar Hinweise auf bisher nicht beschriebene Antigene zu erlangen.

3.4.3 Expositionsabhängiger Vergleich der IgE-AK-Profile im ImmunoCAP-Test

Für 1 High-Spender/-in, 3 Low-Spender/-innen und 2 beruflich Exponierten wurde der Immuno-CAP-Test von synlab Augsburg durchgeführt. Für die standardisierte *A. fumigatus*-Diagnostik stehen aktuell rAspf1, rAspf3, rAspf4, rAspf6 und *A. fumigatus* zur Verfügung. Wenngleich auf niedrigem Niveau, konnten die beruflich Exponierten anhand von rAspf3 (peroxisomales Protein) oder rAspf1 (Mitogilin) identifiziert werden.

Das Gesamt-IgE zeigte bei den gesunden Probanden/-innen keine statistischen Auffälligkeiten. Aus Kostengründen wurde die Analyse aller weiteren Spender/-innen unterlassen.

3.4.4 Gegenüberstellung der Ergebnisse von Western Blot und ImmunoCAP-Test

Der Immuno-CAP-Test als Goldstandard in der momentanen Allergiediagnostik konnte die beiden beruflich Exponierten anhand von rAspf3 und/ oder rAspf1 identifizieren, obgleich keine Hypersensibilitätserkrankung vorlag.

Für dieselben Probanden/-innen konnte im Western Blot anhand von Aspf3 für 1/2 der beruflich Exponierten keine Bande detektiert werden, obwohl bei ihm 0,11 kU/l im Immuno-CAP-Test gemessen wurden. Hingegen für Aspf1 zeigten sich IgE-AK im Western Blot, die im Immuno-CAP-Test desselben Probanden/ derselben Probandin nicht nachgewiesen wurden. Somit sind die Daten nicht kongruent.

Insgesamt zeigt der Western Blot sensitivere Ergebnisse und konnte in einer breiteren Antigen-Diversität durchgeführt werden, allerdings differieren die Werte vom Standardtest der Hypersensibilitätserkennung. Während der Immuno-CAP-Test auf eine Nachweisgrenze von $< 0,1$ kU/l limitiert ist, detektiert der Western Blot auch bei noch geringeren IgE-Konzentrationen Banden. Allerdings wurden hier größere Mengen an Serum benötigt. Während für den derzeitigen Goldstandard etwa 0,15 mL pro getestetem Antigen gerechnet werden müssen, wurden im Western Blot 8 mL Serum eingesetzt. Könnte man alle 13 Nachweise aus dem Western Blot auf den Immuno-CAP-Test übertragen, entspräche dies mit 2 mL 25% der Menge.

4. Diskussion

A. fumigatus ist ein ubiquitär verbreiteter Schimmelpilz, dessen Sporen aufgrund der geringen Größe bis in die Lungenalveolen vordringen können [5, 54, 55]. Im Rahmen des globalen Klimawandels, der über erhöhte CO₂-Konzentrationen die Sporenproduktion durch Schimmelpilze steigert [61], gewinnt die *Aspergillus*-Diagnostik zunehmend klinische Relevanz. Heutzutage gehört *A. fumigatus* zu den Hauptursachen von allergischen Erkrankungen [53] wie Rhinosinuitiden, fungalem Asthma und SAFS [57]. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Exposition in erhöhten spezifischen T-Zell-Frequenzen resultiert, die mittels Zytokin-Bestimmungen erfassbar sind [42, 186]. Die Besonderheit dieser Studie ist, dass Biolandwirte/-innen, für die ein erhöhtes *Aspergillus*-assoziiertes Risiko für Hypersensivitätserkrankungen besteht [21, 56, 60], vergleichend mit Langzeitexponierten und niedrig Exponierten untersucht wurden.

4.1 Methodik zur Gewinnung von *Ascomycota*-Lysaten

Um die spezifische Immunantwort auf *A. fumigatus* und verwandte *Ascomycota* zu messen, ist eine Stimulation der T-Zellen mittels spezifischer Antigene und Lysate bzw. die Antigen-AK-Interaktion zwischen den Immunglobulinen des Spenders und den definierten Antigenpräparationen des Schimmelpilzes entscheidend.

Da das Phänomen der Kreuzreaktivität bei *Ascomycota*, zu denen *A. alternata*, *A. fumigatus*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* zählen, weitverbreitet ist [54], können Spezies-spezifische Antigene möglicherweise eine Lösung sein, um zwischen Co-Exposition, Co-Sensibilisierung und Kreuzreaktivität zu unterscheiden [54, 158].

Für *A. alternata*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* waren keine kommerziellen Hyphenlysate erhältlich, weshalb ein Protokoll zur Lysatgewinnung etabliert wurde.

Die Morphologie und Eigenschaften der verschiedenen Pilzspezies wiesen ein breites Spektrum auf, weshalb für jeden Organismus die optimale Zeitspanne des *Bead Beatings* bestimmt werden musste, um die bestmögliche Proteinkonzentration und Lysatqualität zu gewährleisten.

Wir konnten in Übereinstimmung mit der bisherigen Literatur nur geringe Proteinkonzentrationen in den *Ascomycota*-Lysaten erzielen, wohingegen für Hefen wie *C. albicans* eine höhere Proteinextraktion zu erwarten wäre [163]. Dies könnte am Zellwandaufbau der Schimmelpilze liegen. Im Vergleich zu Hefen liegt ihr Chitingehalt mit 10 bis 20% Trockenmasse etwa 10fach höher, was in einer verbesserten Zellwandintegrität resultiert [187, 188]. Das hat zur Folge, dass *Ascomycota* schwerer zu lysieren sind.

Jedoch war das *Bead Beating* und damit einhergehend die Lyse der Zellen zeitlich begrenzt. Bereits nach kurzer Zeit konnte ein Maximum des Proteingehalts im Lysat verzeichnet werden. Ein Rückgang des Proteingehalts im Zeitverlauf könnte auf der Freisetzung von intrazellulären Proteasen basieren, die Proteine abbauen [189]. Zudem wird durch die mechanische Arbeit Wärme entwickelt, die möglicherweise ebenfalls zur Degradation der Proteine führen könnte [187, 190, 191]. Demnach ist der Zeitpunkt der maximalen Proteinkonzentration auszumachen, der sich aus zwei gegenläufigen Faktoren bedingt. Das *Bead Beating* ist solange von Nöten, bis die Proteindegradation durch Proteasen und Wärmeentwicklung die Freisetzung von Proteinen aus den Hyphen übersteigt. Auch sollten Hyphensuspension sowie Lysat gekühlt gelagert werden, um proteolytische Aktivität zu unterbinden.

Ein weiterer Grund für die niedrige Proteinkonzentration könnte auf der mechanischen Zerkleinerung der Hyphensuspension durch die Kanülen beruhen. Zwar ermöglicht dieser Schritt, das Hyphenmaterial besser zu dosieren, allerdings könnte dies bereits vor der eigentlichen Lyse zu Zellwandrupturen führen und Proteine freisetzen [191]. Die Suspension wurde im Anschluss erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert, sodass diese Proteine später nicht mehr im Lysat enthalten wären. Auch könnte möglicherweise frühzeitig die proteolytische Aktivität beginnen, die die eigentliche Lyse beim *Bead Beating* zeitlich stark begrenzt.

Vitale Pilze wurden eliminiert, indem die Lysate durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatz steril gefiltert wurden, um konstante Proteinkonzentrationen und damit reproduzierbare Ergebnisse bei T-Zell-Tests und Antikörpermessungen zu gewährleisten. Bei grobmaschigeren Filtern könnten immunogene Aggregate und Zellwandfragmente im Lysat verbleiben und Einfluss auf die Konstanz der Stimulationsergebnisse haben.

4.2 PBMC-basierter ELISpot zur Detektion expositionsabhängiger Unterschiede der T-Zell-Immunantwort auf spezifische *A. fumigatus*-Antigene

4.2.1 Messabweichung bei frühzeitiger Vorbereitung der ELISpot-Platten

Das Ausplattieren der Antigen-Stimulationsmixe zum Zeitpunkt der PBMC-Isolation bleibt der Standard für PBMC-basierte ELISpot-Analysen. Bei einer Testung von großen Mengen an Antigenen (und auch in der klinischen Routine) ist dies nicht zwangsläufig praktikabel. So wurde eruiert, dass eine Vorbereitung der ELISpot-Platten 2h vor PBMC-Isolation für IFN- γ -, IL-5- und IL-17A-SFC-Zahlen keine relevanten Unterschiede zeigt, wohingegen eine deutlich vorzeitige Bereitstellung (15h vor PBMC-Isolation) zum Anstieg der Messwerte führt. Um die Variabilität in den Ergebnissen zu minimieren und damit für eine Vergleichbarkeit der Resultate zu sorgen, sollten daher frühestens 2h vor PBMC-Isolation Antigen-Stimulationsmixe im ELISpot-Verfahren ausplattiert werden. Dies hilft dabei die Arbeitsschritte des Ausplattierens und der PBMC-Isolation zu entzerren und ermöglicht, die Analyse, ohne auf eine weitere personelle Hilfe angewiesen zu sein, durchzuführen.

4.2.2 LPS-induzierte unspezifische Stimulation von T-Zellen

In meinen Experimenten konnte ich nachweisen, dass LPS einen Einfluss auf die Zytokinsekretion nach T-Zell-Stimulation hat, der interindividuell unterschiedlich hoch ausfällt. Im Gegensatz zu früheren Versuchen wurden daher in dieser Studie strengere LPS-Grenzwerte (0,11 EU/mL) festgelegt und Lysate auf industriellem Niveau verwendet. Die eigens hergestellten Lysate wurden wegen LPS-Kontamination vom weiteren Versuch ausgenommen. Vermutlich handelte es sich bereits um eine bakterielle Verunreinigung der Konidiensuspensionen, die ebenfalls einen erhöhten LPS-Gehalt aufwiesen und der trotz Penicillin-Streptomycin als Antibiotikum in der Hyphenkultur weiter nachweisbar blieb.

Die Höhe der LPS-induzierten T-Zell-Aktivität hängt einerseits von der Endotoxin-Konzentration *per se* ab. Je höher die LPS-Konzentration, desto mehr T-Zell-Aktivität ist zu verzeichnen. LPS als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien [39] wird über APZs den T-Zellen präsentiert, was zu deren vermehrten Aktivierung und folglich

zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IFN- γ , IL-17A) führt [40]. IL-5 im Rahmen einer T_H2-Reaktion spielt hierbei nur eine untergeordnete Rolle.

Des Weiteren finden sich interindividuelle Unterschiede in der Suszeptibilität von LPS. Je nach Spender/-in erzielt dieselbe Endotoxin-Konzentration unterschiedlich starke T-Zell-Reaktionen. Der Grund könnten Polymorphismen auf Genebene sein, die die MHC-II-Bindungsaffinität zum Antigen oder die Erkennung durch den TZR beeinflussen [192, 193]. Koch et al. vermuten einen Zusammenhang mit allergischem Asthma und einer damit einhergehenden verminderten TLR4-Expression [39]. Da TLR4 der PAMP-Erkennungsrezeptor ist, werden folglich weniger T-Zellen durch APZs aktiviert und die proinflammatorische Zytokinantwort der T-Zellen durch LPS fällt geringer aus. Dies würde bedeuten, dass Personen mit Hypersensibilitätsneigung eine geringere LPS-Suszeptibilität haben als Gesunde.

4.2.3 A. *fumigatus*-spezifische T_H1-Antwort bei Biolandwirten/-innen erhöht

Es zeigten sich bei den Biolandwirten/-innen erwartungsgemäß erhöhte T_H1-Antworten auf die Mehrzahl der verwendeten spezifischen *A. fumigatus*-Antigene [42, 186], die möglicherweise eine Schimmelpilzbelastung serologisch nachweisbar machen. Insgesamt sind für 8 der 12 getesteten Antigene bei Biolandwirten/-innen mindestens 2-fach höhere SFC-Zahlen im Vergleich zur Kontrollkohorte zu verzeichnen. Die maximalen IFN- γ -Antworten als Signaturzytokin für die T_H1-Prägung weisen AspF4 und Crf1 auf. Die Funktion von AspF4 ist bisher unklar [91]. Crf1 ist ein GPI-verankertes Zellwandprotein, das der Integrität der Membran dient [101]. Insbesondere in Wachstumszonen und Knospungsbereichen ist es vermehrt detektierbar [100]. Somit ist für Crf1 als Bestandteil der Zellwand die Wahrscheinlichkeit einer Immunerkennung hoch, jedoch ausgeprägter je intensiver der Kontakt zu *A. fumigatus* ist. Identisch mit dieser Annahme zeigen sich die beiden höchsten T-Zell-Antworten bei beruflich Exponierten. Bei häufiger und starker Konfrontation mit *A. fumigatus*-Sporen wird das Antigen vermehrt naiven T-Zellen präsentiert, die sich entsprechend spezifizieren.

Was die Unterscheidung von Langzeitexponierten zu beruflich exponierten Biolandwirten/-innen erschwert, sind teilweise überlappende T_H-Zellfrequenzen. Bacher et al. verweisen auf die Funktion von Treg-Zellen der adaptiven Immunantwort [194], die regulativ im Sinne einer Limitation eine überschießende Immunantwort bei hoher

Sporenbelastung verhindern. Lauruschkat et al. konnten zeigen, dass Signaturzytokine der Treg-Zellen bei Biolandwirten/-innen im Vergleich zur Kontrollpopulation deutlich erhöht waren [195].

Die spezifischen *A. fumigatus*-Antigene AspF22, CatB und CipC konnten im Gegensatz zum *Aspergillus*-Lysat eine Trennschärfe zwischen den beiden Kohorten hinsichtlich ihrer IFN- γ -Zytokinantwort erzielen. AspF22, CatB und CipC weisen in unseren Analysen hohe Median-zu-Median-Unterschiede auf. Dennoch sind diese Ergebnisse auf Grund der zu geringen Probandenzahl und der großen interindividuellen Variabilität nicht signifikant, wobei für alle 3 Antigene $p < 0,2$ gilt. In der Zukunft sind weitere Untersuchungen nötig, um den Einsatz dieser Antigene in einem effektiven Biomonitoring für berufliche Schimmelpilzbelastung und *Aspergillus*-assoziierte Hypersensitivitätssyndrome zu ermöglichen. Auf Basis der bisherigen Untersuchungsergebnisse wird ein Test basierend auf den T_H1-Antworten der 3 ermittelten Antigene vorgeschlagen, bei dem mittels Grenzwerten (Median der beruflich Exponierten) bisher eine Sensitivität von 60%, eine Spezifität von 80% und ein positiv prädiktiver Wert von 75% erreicht wird.

Die Enolase AspF22, die Plasmaregulatoren binden und zur Gewebeschädigung in der Lunge beitragen kann, ist stark verwandt zur *C. albicans*-Enolase und Enolasen anderer mikrobieller Pathogene [54, 160, 196]. Weil Biolandwirte/-innen nicht nur einer erhöhten *A. fumigatus*-Belastung ausgesetzt sind, sondern im Rahmen ihrer beruflichen Ausübung auch mit anderen Mikroben vermehrt in Kontakt kommen, ist eine Unterscheidung zwischen tatsächlicher Aktivität der AspF22 und einer co-exponierten Enolase nicht endgültig möglich.

CatB ist eine Katalase und kommt nur in Hyphen vor [197]. CipC homologe Proteine sind ausschließlich in Pilzen zu finden, v.a. im Zytosol der Hyphen, [131] und werden insbesondere bei steigender CO₂-Konzentration vermehrt transkribiert [133]. Da *Aspergillus*-Konidien ubiquitär in der Luft vorkommen, werden sie von jedem eingeatmet, aber in der Regel direkt von der mukoziliären Clearance beseitigt, ehe sie zu Hyphen auskeimen können. Daher dürfte hier die T-Zell-Prägung auf CatB und CipC kaum vorhanden sein. Atmen beruflich Exponierte jedoch deutlich höhere Sporenkonzentrationen ein, kann die angeborene Immunantwort zunächst nur einen

Großteil der Konidien abtransportieren, sodass die verbliebenen Sporen auskeimen und zu einer T-Zell-Prägung führen.

4.2.4 A. *fumigatus*- spezifische T_H2-Antwort bei Biolandwirten/-innen erhöht

Im Kontext von Allergien ist die IL-5-Reaktion von Interesse. Es zeigten sich bei den Biolandwirten erwartungsgemäß erhöhte T_H2-Antworten auf die Mehrzahl der verwendeten spezifischen *A. fumigatus*-Antigene [42, 186], die möglicherweise eine Schimmelpilzbelastung serologisch nachweisbar machen. Erhöhte T_H2-Immunreaktionen müssen nicht zwangsläufig in einer Hypersensivitätserkrankung münden, sofern sie mit einer adäquaten T_H1-gerichteten Immunantwort einhergehen. Nicht bei ausgeglichener T_H2/T_H1-Balance, sondern bei einer isolierten T_H2-Erhöhung wurde in der Literatur eine Assoziation zu allergischen Erkrankung beschrieben [198-201]. Das heißt: je höher die T_H2-Antwort ist, desto höher muss auch die T_H1-Antwort ausfallen, um eine effektive Immunantwort ohne Krankheitswert zu gewährleisten.

Die Reaktion auf das Lysat ist hier deutlich stärker als auf die einzelnen Antigene. Das Lysat enthält eine nicht näher festgelegte Kombination aus verschiedenen Proteinen des *A. fumigatus*, wohingegen die Antigene singular betrachtet werden. Prinzipiell eignen sich Antigene jedoch besser als das Lysat, da sie standardisiert hergestellt werden können, spezifisch und damit weniger anfällig für Kreuzreaktionen mit konservierten Proteinen anderer Pilze sind.

Am geringsten fällt die Reaktion für T_H2-Zellen auf Pst2 aus. Dies lässt sich mittels seiner Funktion erklären. Pst2 wird unter oxidativem Stress hochreguliert [149], um *A. fumigatus* auf die Hypoxie bei Lungenschädigung anzupassen [151]. Da es sich bei den Studienteilnehmern/-innen um Personen ohne gesundheitliche Probleme handelt, ist davon auszugehen, dass die Sauerstoffsättigung nicht erniedrigt und damit bei den *A. fumigatus*-Expositionen keine Pst2-Hochregulation stattfand.

Statistisch relevant zeigen sich AspF22, CipC, CatB und Hly, wobei AspF22 und CipC mit Einbeziehung der Benjamini-Hochberg-Korrektur (FDR < 0,2) statistisch signifikant (p < 0,05) sind. Ein hypothetischer Test zur serologischen Nachweisbarkeit einer erhöhten beruflichen Schimmelpilzbelastung, basierend auf den T_H2-Antworten der 4 ermittelten Antigene und festgelegten Grenzwerten (Median der beruflich Exponierten), erreicht eine Sensitivität von 70%, eine Spezifität von 80% und einen positiv prädiktiven

Wert von 77,8%. Inwiefern diese Überlegungen praxistauglich sind, müsste zunächst in größeren Studien eruiert werden, um auf signifikantem Niveau ein effektives Biomonitoring für berufliche Schimmelpilzbelastung und *Aspergillus*-assoziierte Hypersensitivitätssyndrome zu gestalten.

4.2.5 T_H17-Antwort ohne wesentliche expositionsabhängige Unterschiede

Die IL-17A-Antwort weist für sich genommen keine wesentlichen Expositionsabhängigen Unterschiede auf. Im Gegensatz zu den gesunden hochexponierten Biolandwirten/-innen konnten wir und Bacher et al. kürzlich zeigen, dass Patienten/-innen mit *Aspergillus*-assoziierten Hypersensivitätserkrankungen stark erhöhte T_H17-Zellantworten bei Antigenstimulation aufweisen [159, 202]. IL-17 wird mitverantwortlich gemacht für das Remodeling der Atemwege in Asthmatikern/-innen [203], wobei ein hoher IL-17A-Spiegel als Risikofaktor für schweres Asthma gilt [203-205]. Eine verlängerte erhöhte T_H-17 Antwort ist den Ergebnissen dieser Studie zufolge nicht prinzipiell aufgrund der chronischen beruflichen Sporenbelastung vorhanden, sondern vielmehr Ausdruck einer pathologischen Hypersensitivitätsreaktion bei chronischer Exposition.

Am Rande ist zu beachten, dass zwischen 2 Formen des Asthmas unterschieden werden muss: das weitläufig bekannte Eosinophilen-medierte Asthma und ein Neutrophilengeleitetes Asthma [206]. IL-17A sorgt für die Neutrophilen-Aggregation in der Lunge [207], T_H2-getriggert kommt es zum Eosinophilen-Influx und IgE-Produktion [208]. Bei einem Eosinophilen-medierten Asthma ist IL-17A nicht zwangsläufig erhöht und *vice versa*.

4.2.6 Expositionsabhängiger Vergleich von T_H2 zu T_H1 im allergischen Kontext

Die in der T_H2-Auswertung noch statistisch relevanten Antigene (Aspf22, CipC, CatB und Hly) bei Biolandwirten/-innen, zeigen im T_H2/T_H1-Verhältnis keine Auffälligkeiten. Im Vergleich der beruflich Exponierten zur Kontrollkohorte lässt sich für sämtliche geprüften *A. fumigatus*-Antigene keine statistische Signifikanz hinsichtlich des T_H2/T_H1-Gleichgewichts feststellen. Damit ist eine chronische berufliche Exposition, die als potenzielles Risiko für assoziierte Hypersensivitätserkrankungen gilt [46, 209], nicht *per se* mit einem verschobenen Gleichgewicht der Immunreaktion verbunden. Eine IL-

5/IFN- γ -Imbalance bei isolierter T_H2-Erhöhung liegt vermutlich erst bei einer tatsächlichen Erkrankung des allergischen Spektrums vor [198-201].

Für Crf1 ist ein Trend ($p = 0,111$) hinsichtlich eines erhöhten T_H2/T_H1-Verhältnisses bei der Kontrollkohorte zu eruieren. Bei der weiteren Aufschlüsselung der Kontrollgruppe zeigt sich im Mann-Whitney-U-Test eine Signifikanz ($p = 0,0367$) im Vergleich zwischen niedrig und hoch exponierten Kontrollprobanden/-innen. Crf1 ist als abundantes Zellwandprotein [99] sofort für das Immunsystem zugänglich und so bereits bei geringer *A. fumigatus*-Exposition immunogen. Für eine Allergieentwicklung ist eine niedrige Dosis an *A. fumigatus*-Sporen ausreichend (angesichts dessen ubiquitärer Verbreitung hiervor niemand geschützt ist) [25]. Entsprechend mehreren Studien, die höhere Prävalenzen für Hypersensitivitätserkrankungen im städtischen Umfeld als in ländlichen Gebieten beobachteten [210-214], ist eine wiederholte, intensivere Exposition zu Umweltallergenen womöglich sogar protektiv bezüglich Hypersensitivitätserkrankungen. Hohe Dosen würden eher zu ausgeprägten T_H1-Antworten führen [25] und negativ zwischen hoher Exposition und allergischem Asthma korrelieren [215].

Ein Vorteil, die T_H2-Antwort mit der T_H1-Immunreaktion ins Verhältnis zu setzen, ist, dass Messfehler durch Kreuzreaktivität minimiert werden können. Da sich einige Spezies dieselbe ökologische Nische teilen und gleichermaßen phylogenetisch hoch konservierte Proteine exprimieren, wird möglicherweise nicht nur die Antwort auf *A. fumigatus* gemessen, sondern auch auf andere (Schimmel-)Pilze. Setzt man die T-Zellantworten ins Verhältnis, werden die absoluten Zellzahlen irrelevant. Entscheidend ist dann nur die Balance bzw. Ausrichtung der Immunabwehr, welche mutmaßlich in einem Individuum beim gleichen Antigentyp nahezu identisch ausfällt.

4.2.7 Expositionsabhängiger Vergleich von T_H17 zu T_H1 im allergischen Kontext

Die beruflich Exponierten weisen ein niedrigeres T_H17-/T_H1-Niveau auf als die Kontrollgruppe. Für Aspf22 ist der Unterschied im T_H17/T_H1-Niveau ($p = 0,028366$) statistisch signifikant. Weitere Antigene, die diese Relationen gut zeigen sind Aspf4 ($p = 0,140$) und Crf1 ($p = 0,153$). Ein Grund könnte sein, dass die Biolandwirte/-innen viel unter freiem Himmel arbeiten und demnach bei ihnen im Durchschnitt höhere Vitamin-

D-Spiegel zu erwarten sind. Für Vitamin D wurde beschrieben, dass es hemmenden Einfluss auf die Sekretion von IL-17 [216] bzw. auf T_H-17-Zellen [217] nimmt.

Im Gegensatz zu den gesunden hochexponierten Biolandwirten/-innen konnte kürzlich gezeigt werden, dass Patienten mit *Aspergillus*-assoziierten Hypersensitivitätserkrankungen stark erhöhte T_H17-Zellantworten bei Antigenstimulation aufweisen [159, 202].

4.2.8 Auswirkungen des Alters auf die Immunantwort

Insgesamt zeigt die Auswertung der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zell-Reaktionen hohe interindividuelle Schwankungsbreiten. Insbesondere die drei ältesten Probanden/-innen (70J., 65J., 50J.) der vorliegenden Studie weisen T-Zell-Messungen auf, die weit unter dem Median der jeweiligen Kohorte liegen.

Zwar können auf Basis dieser 3 Messreihen in dieser Studie keine signifikanten Trends erzielt werden, dennoch überschneiden sich die Ergebnisse mit der Literatur, dass die Fähigkeit des Immunsystems, Antigene zu erkennen, im Alter abnimmt. Für T-Zellen bedeutet das in Zahlen ein Rückgang um 2 Potenzen von etwa 10⁸ auf etwa 10⁶ verschiedene Antigene, die vom Immunsystem registriert werden [218]. Zudem werden nach Isolation *in vitro* weniger T-Zellen stimuliert und weniger Zytokine sezerniert [219]. Hintergründe sind u.a. eine Verschiebung des Gleichgewichts auf Ebene der hämatologischen Stammzellen von der lymphoiden hin zur myeloiden Reihe. Außerdem bildet sich der Thymus im Laufe des Lebens zurück, was in einer geringeren Produktion naiver T-Zellen resultiert. Es fehlt zudem der Ort der Differenzierung, T-Zell-Diversifizierung und Selektion [220]. Ebenso betroffen von den Alterungsprozessen sind B-Zellen, deren Anzahl ebenfalls rückläufig ist [221].

In einer angegliederten Erweiterung der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass die Berufsdauer in der Biolandwirtschaft, die in der Regel mit erhöhtem Alter der Probanden/-innen einhergeht, mit einem schwach bis mäßig erhöhten T_H2-/T_H1-Verhältnis einhergeht [195]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Chang et al., die von einer altersabhängigen T_H1-/T_H2-Balance berichten. In der Wachstumsperiode sei die Immunreaktion mehr T_H1-gerichtet, im Alter liege eine höhere T_H2-Polarisation vor [199].

Dass es also zu hohen Schwankungsbreiten der Antigen-spezifischen T-Zell-Reaktionen kam, könnte zumindest teilweise durch Alterseffekte erklärt werden. Altersgrenzen finden in der EBV-Diagnostik bereits klinischen Einhalt [222, 223].

So müsste der Effekt des Alters auf die T-Zell-Frequenzen mit einer größeren Studienpopulation weiter untersucht werden, könnte es aber nötig machen, altersspezifische Richtwerte in der *A. fumigatus*-Diagnostik zu etablieren.

4.2.9 Einfluss der Jahreszeit auf die *A. fumigatus*-spezifische Immunantwort

Trockenes Klima (< 70% Humidität) und hohe Temperaturen (> 30°C) sind mit höheren *A. fumigatus*-Konzentrationen in der Luft verbunden, wobei eine erhöhte aerogene Sporenkonzentration positiv mit allergischen Fällen korreliert [224]. Die Belastung ist also im Sommer und Herbst höher als im Winter [225].

Demnach ist eine Schwäche der Studie, dass die Probanden/-innen über einen langen Zeitraum zwischen August und Dezember rekrutiert wurden. Ob die Saisonalität tatsächlich einen entscheidenden Einfluss hat, wenn man beruflich Exponierte mit nicht beruflich exponierten Probanden/-innen vergleicht, ist fraglich und aufgrund hoher interindividueller Schwankungen bei gleichzeitig geringer Probandenzahl in unserer Studie nicht festzustellen. Da *A. fumigatus* sowohl in der Erntezeit als z.B. auch bei den Arbeiten im Weinkeller präsent ist, ist es wahrscheinlich, dass Biolandwirte/-innen ganzjährig eine höhere Exposition im Vergleich zur Kontrollgruppe haben. Allerdings liegt dennoch eine jahreszeitliche Schwankung nahe. Für Klarheit müsste man die Probanden/-innen im Rahmen einer Längsschnittstudie im jahreszeitlichen Verlauf testen und analysieren.

4.2.10 Stärken und Schwächen der ELISpot-Analyse

Der Vorteil der Verwendung von PBMCs ist, dass zum einen peripheres humanes Blut gut zugänglich ist und zum anderen, dass trotz eines begrenzten Blutvolumens verschiedene Versuchsbedingungen eruiert werden können. Da PBMCs aber aus verschiedenen Zelltypen bestehen, die bestimmte Zytokine sezernieren können (neben CD4- und CD8-positiven T-Zellen können u.a. auch NK-Zellen IFN- γ freisetzen, und Neutrophile IL-17 produzieren), ist ein direkter Rückschluss auf die Aktivität von T-

Zellen nur mit Vorsicht zu ziehen [226]. Dennoch hat sich die Methode bewährt, da durch die Anwendung von T-Zell-spezifischen Antikörpern im ELISpot-Verfahren die Messungengenauigkeit reduziert werden kann. In vorliegender Studie wurden daher CD28 und CD49d, die als spezifische TZR-Liganden agieren, eingesetzt [227].

Bei der Blutentnahme spiele der Fastenstatus eine Rolle, da über das Sättigungshormon Leptin bei Nahrungsaufnahme bzw. Hyperglykämie eine inflammatorische Zytokin-Antworten getriggert werde. Außerdem könne der Zeitpunkt der Blutabnahme im Hinblick auf die zirkadiane Rhythmik von Cortisol, das wiederum IFN- γ beeinflusse, ebenfalls ein Störfaktor sein [228]. Innerhalb dieser Studie wurden die Blutentnahmen alle vormittags durchgeführt, wenngleich nicht immer zur selben Zeit, der Fastenstatus blieb unbeachtet.

Das ELISpot-Verfahren ist für Tuberkulose und CMV-Erkrankungen ein anerkanntes Diagnosetool, daher in der Klinik bereits etabliert [229] und auf die Schimmelpilzdiagnostik übertragbar. Ähnlich wie beim Tuberkulosestest [230] besteht auch bei der Verwendung von *A. fumigatus*-Lysaten eine erhöhte Suszeptibilität bezüglich Verzögerungen im Messverfahren [168]. Eine Begrenzung der präanalytischen Lagerung erscheint sinnvoll, wobei dies die sofortige Verfügbarkeit eines Laboranten voraussetzt. Ob Proteine ggf. weniger anfällig sind, bleibt zu klären. Eine Auswertung der ELISpot-Analyse ist frühestens nach 27h für IFN- γ - und 48h für IL-5- bzw. IL-17A möglich.

Eine Stärke des ELISpot-Verfahrens ist die hohe Sensitivität der Analyse, die auf Einzelzellanalysen beruht. Im Vergleich zum ELISA ist die ELISpot-Analyse um bis zu 100 mal sensitiver [231].

Zu den Limitationen der Studie zählen die geringe Probandenzahl und eine fehlende prospektive Validierung der vielversprechenden Antigen- und Zytokin-kombinationen in einer unabhängigen Kohorte beruflich exponierter Probanden/-innen. Auch wäre ein Vergleich zu Biolandwirten/-innen mit Hypersensitivitätserkrankungen bereichernd gewesen. Da in der Biolandwirtschaft neben *A. fumigatus* einige andere Schimmelpilze eine wichtige Rolle spielen, wäre es sinnvoll gewesen, die Zytokinantworten auf *A. alternata*, *C. herbarum* und *P. chrysogenum* ebenfalls vergleichend zu erheben [232-

234], was jedoch wie erwähnt aufgrund von LPS-Kontamination bisher nicht möglich war.

4.3 Detektion *A. fumigatus*-spezifischer IgE-Antikörper

Die T_H2-dominierte Immunantwort führt über B-Zell-Aktivierung zur Produktion von spezifischem IgE, welches im Rahmen der Hypersensibilitätsdiagnostik hohen Stellenwert besitzt. Insbesondere in ABPA-Patienten/-innen, die an einer schweren Ausprägung der allergischen Erkrankung auf *Aspergillus* leiden, werden große Mengen an *Aspergillus*-spezifischem IgE freigesetzt, was über die konstante Atemwegsentszündung die Lungenfunktion verschlechtert und bei Mukoviszidose-Grunderkrankung zur Todesursache werden kann [15]. Im Western Blot können *A. fumigatus*-spezifische IgE-AK detektiert werden.

Aspf3-IgE ist bei den Biolandwirten/-innen statistisch signifikant erhöht. Der ImmunoCAP-Test, der momentane Goldstandard der Allergiediagnostik, identifizierte die 2 getesteten beruflich Exponierten anhand von rAspf3 (und/oder rAspf1) ebenfalls. Weshalb sich zwischen ImmunoCAP-Test und Western Blot bei zum gleichen Zeitpunkt abgenommenem Serum Messunterschiede ergeben und inkongruente Datensätze erhoben wurden, ist jedoch unklar. Bei Aspf3 handelt es sich um eine Thioredoxin-Peroxidase, die ROS im Rahmen der Immunabwehr inaktiviert [90]. Allerdings gehört Thioredoxin zu den phylogenetisch hoch konservierten Proteinen, die damit eine hohe Kreuzreaktivität zu Umweltallergenen aufweisen [54, 160]. Statistisch gesehen müssten T-Zellen, die i.d.R. nur kleinere Peptide mit ihrem TZR erkennen und deren intrinsische Affinität bei mehrfacher Antigenkonfrontation nicht zunimmt, jedoch anfälliger für Kreuzreaktivität sein [155]. Dass in den ELISpot-Analysen nicht, im Western Blot aber schon, anhand von Aspf3 zwischen den Kohorten differenziert werden kann, könnte Hinweis auf die geringere Kreuzreaktivität von Aspf3-IgE sein. So gilt Aspf3-IgE (wie bereits im Immuno-CAP-Test etabliert) als vielversprechender Kandidat zur spezifischen Detektion von chronischer *A. fumigatus*-Belastung und assoziierten Hypersensibilitätserkrankungen.

Zwei spezifische IgE-AK können in allen Probanden/-innen nachgewiesen werden: Aspf22 und Crf1. Relevante Unterschiede zwischen den Kohorten sind nicht

auszumachen. Für Aspf22 zeigten sich im Gegensatz dazu in der ELISpot-Analyse statistisch höhere T_H1 - und T_H2 -Immunreaktionen bei Biolandwirten/-innen. Die T_H2 -/ T_H1 -Balance ist jedoch wieder in beiden Gruppen gleich. Für Crf1 wurde ein erhöhtes T_H2 / T_H1 -Verhältnis bei der Kontrollkohorte, insbesondere bei Niedrigexponierten, festgestellt. Der Median der T_H2 -Zytokinreaktion wies hingegen keine Gruppendifferenzen auf. Ein niedrigeres T_H17 -/ T_H1 -Niveau bei beruflich Exponierten ist den Allergenen Aspf22 und Crf1 gemeinsam.

Bei unabhängig von der Exposition gleicher IgE-AK-Produktion und einem synergistisch Zusammenhang zu T_H2 bzw. zum T_H2 -/ T_H1 -Verhältnis, müsste sich auch auf T-Zell-Niveau ein vergleichbares Bild ergeben [208, 235]. Hier zeigen sich jedoch zwischen den Kohorten die genannten Unterschiede. Weshalb IgE-Antworten und T_H -Zellzahlen nicht miteinander korrelieren, gilt es weiter aufzuklären. Womöglich sind auch an dieser Stelle regulatorische Zelltypen oder weitere Zytokine involviert, die in gesunden Probanden/-innen wirksam werden und vor Hypersensibilitätserkrankungen schützen.

Ein Vorteil des Western Blots gegenüber des gängigen Immuno-CAP-Tests sind insgesamt sensitivere Ergebnisse und ein erweitertes *A. fumigatus*-spezifisches Antigenpektrum. Während der Immuno-CAP-Test auf eine Nachweisgrenze von $< 0,1$ kU/l limitiert ist, detektiert der Western Blot auch bei noch geringeren IgE-Konzentrationen Banden. Ob es im allergischen Kontext notwendig ist, die Nachweisgrenze vom Immuno-CAP-Test ($< 0,1$ kU/l) zu unterbieten, ist fraglich.

Was die Diagnostik erschwert, sind die hohen Abweichungen der IgE-Konzentrationen innerhalb der Gesunden, atopischen Asthmatikern/-innen und ABPA-Patienten/-innen. Ein Wert $> 0,35$ kUA/L für *Aspergillus*-spezifisches IgE und > 1000 IU/mL des Gesamt-IgEs werden als Grenzwerte vorgeschlagen [9]. Insgesamt zeigen die Western Blots mit Ausnahme von Aspf3 kein einheitliches Bild und machen eine Differenzierung zwischen den beiden Kohorten impraktikabel. Dies kann an den bereits oben angesprochenen hohen interindividuellen Varianzen liegen. Grund hierfür könnte aber auch sein, dass erhöhte IgE-Reaktionen erst bei Hypersensibilitätserkrankungen auftreten. Die Probanden/-innen in der vorliegenden Studie waren jedoch alle gesund.

Um einzuschätzen, welche diagnostische Aussagekraft der Western Blot in der Allergiediagnostik hat, wären Serumproben von Allergiepateinten und ABPA-Patienten/-

innen notwendig. Wäre daraufhin ein signifikanter Unterschied zu Gesunden und auch zwischen den Schweregraden der zu Grunde liegenden immunologischen Ursache sichtbar, könnte das Western-Blot-Verfahren eine Option für die zukünftige Hypersensibilitätsdiagnostik sein.

4.4 Umweltmedizinische Anwendungsmöglichkeit der B- und T-Zell-Assays

Die Inzidenz von Pilzsensibilisierungen und allergischen Atemwegsproblemen steigt in den nächsten Jahren im Zuge des Klimawandels womöglich an, da höhere CO₂-Konzentrationen in der Luft mit einer erhöhten Pilzkolonisierung von Pflanzen einhergehen. Die spezifische *A. fumigatus*-Diagnostik ermöglicht frühzeitig im Biomonitoring Risikogruppen wie Biolandwirte/-innen zu ermitteln und Hypersensibilitätserkrankungen zu detektieren, sodass der Auslöser gemieden und ggf. kausal therapiert werden kann. Da für die Krankheiten des allergischen Spektrums (allergische Sinusitis und Rhinitis, extrinsische allergische Alveolitis, SAFS, ABPA und Hypersensitivitäts-Pneumonitis) auch weitere Pilze wie *Alternaria*, *Penicillium* und *Cladosporium* in Frage kommen [236], sind in der Zukunft aufbauende Experimente mit LPS-freien Lysaten und Proteinen anderer allergologisch relevanter Pilze notwendig.

Neue Aktualität haben *Aspergillus*-spezifische T- und B-Zell-Versuche im Zusammenhang mit COVID-19 bekommen. Insbesondere bei Corticosteroidvorbehandelten Patienten/-innen mit schweren Krankheitsverläufen und mechanischer Beatmung wurde ein erhöhtes Risiko einer CAPA, also einer COVID-19-assoziierten pulmonalen Aspergillose, festgestellt. In Belgien, Frankreich, Niederlande und Deutschland wurden retrospektiv CAPA-Erkrankungsraten von 20-35% ermittelt, die meist durch *A. fumigatus* ausgelöst wurden [237, 238]. Auf Basis des weiten Spektrums an Antigenen, wie sie in dieser Studie verwendet wurden, und Daten von gesunden Probanden/-innen unterschiedlicher Umweltexposition, besteht die Chance, schwere *A. fumigatus*-Erkrankungen frühzeitig in ELISpot und Western Blot zu detektieren. Diese Arbeit legt hierfür einen ersten Grundstein, den es durch weitere Experimente und eine größere Probandenzahl in Zukunft weiterzuverfolgen gilt.

5. Zusammenfassung

Bereits in Vorstudien konnte dargelegt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen der T-Zell-Zytokin-Antwort und der berufs- bzw. umweltbedingten Schimmelpilzbelastung besteht. Ziel der vorliegenden Studie war, eine mögliche Kombination von Biomarkern ausfindig zu machen, die veränderte T-Zell-Antworten auf *A. fumigatus*-Antigene bei beruflich Exponierten im Vergleich zu Kontrollprobanden/-innen vorhersagen kann. Um geeignete Marker für das Bio-Monitoring zu finden, wurden zur T-Zell-Aktivierung ein myzeliales *A. fumigatus* - Lysat und 12 proteinogene Antigene in ELISpot-Versuchen für die Signaturzytokine IFN- γ (T_H1), IL-5 (T_H2) und IL-17A (T_H17) der Haupt-T_H-Subpopulationen getestet. Da in der Pathophysiologie und Diagnostik der Allergien Immunglobuline ebenfalls eine wichtige Rolle spielen, wurden die Seren der Probanden/-innen auf IgE-spezifische AK bezüglich des myzelialen *A. fumigatus* - Lysats und der 12 proteinogenen Antigene im Western Blot untersucht.

Es zeigten sich bei den Biolandwirten/-innen erwartungsgemäß erhöhte T_H1- und T_H2-Antworten auf die Mehrzahl der verwendeten spezifischen *A. fumigatus*-Antigene [42, 186], die möglicherweise eine Schimmelpilzbelastung serologisch nachweisbar machen. Unterschiede in der T_H17-Antwort aufgrund chronischer beruflicher Sporenbelastung ohne Krankheitskorrelat konnten nicht explizit festgestellt werden. Weiterhin ergab sich, dass erhöhte T_H2-Immunreaktionen, sofern sie mit einer adäquaten T_H1-gerichteten Immunantwort einhergehen und damit eine ausgeglichene T_H2/T_H1-Balance besteht, nicht zwangsläufig zu Hypersensivitätserkrankungen führen. Im Vergleich zu Langzeitexponierten wurden teilweise überlappende T_H-Zellfrequenzen bei beruflich exponierten Biolandwirten/-innen ermittelt. Welche entscheidende Rolle Treg-Zellen bei der Eindämmung überschießender Immunantworten einnehmen, kann hieraus erahnt werden.

Die spezifischen *A. fumigatus*-Antigene AspF22, CatB und CipC konnten im Gegensatz zum *Aspergillus*-Lysat eine Trennschärfe zwischen den beiden Kohorten hinsichtlich ihrer IFN- γ - und IL-5-Zytokinantwort erzielen. Auch wenn für ein zukünftiges Biomonitoring weitere Versuche erforderlich sind, eignen sich demnach spezifische Antigene besser, um *A. fumigatus*-Expositionsanalysen und ggf. assoziierte Hypersensivitätserkrankungen zu abbilden.

Die Diskrimination anhand vorhandener B-Zell-getriggelter IgE-Immunantworten erwies sich im Western Blot als schwierig, womöglich aufgrund des subklinischen Status der Probanden/-innen. Einzig das bereits im Immuno-CAP-Test etablierte Aspf3 präsentiert sich wegweisend.

Preliminary studies have already set out a significant correlation between T-cell-cytokine-responses and professional and/or environmental mold contaminations.

This study aimed for a possible combination of biomarkers to predict altered T-cell-responses to *A. fumigatus*- antigens in a defined professionally exposed cohort in comparison with controls. To find out suitable markers for the biomonitoring, T-cell-activation was performed with a mycelial *A. fumigatus*- lysate and 12 proteinaceous antigens in ELISpot assays with look at the main signature cytokines of T-helper cell subsets IFN- γ (T_H1), IL-5 (T_H2) and IL-17A (T_H17). As immunoglobulins play an important role in pathophysiology and diagnostic of allergies, sera of the subjects were examined regarding IgE-specific antibodies against mycelial *A. fumigatus* - lysate and 12 proteinaceous antigens in Western Blot-technique.

As expected, increased levels of T_H1- and T_H2-cytokine responses were found for a majority of examined specific *A. fumigatus*-antigens, which may help to verify mold exposure in a serological way. Differences in T_H17-immune response in agricultural workers without a hypersensitivity disease has not been found. Furthermore, increased T_H2-immune responses don't necessarily lead to a pathologic value since it is followed by an adequate T_H1-answer for upholding the T_H2/T_H1-balance. T_H-frequencies of not occupational exposed individuals partly show overlaps with those of agricultural workers. Therefore, the important role of Treg-cells in containing extensive immune responses is conceivable.

The specific *A. fumigatus*-antigens AspF22, CatB and CipC are (in contrast to *Aspergillus*-lysate) able to drag selectivity in-between the two cohorts regarding their IFN- γ - and IL-5-cytokine response. Even though further investigations must be made, specific antigens are more suitable for exposition-analysis and, eventually, for the depiction of associated hypersensitivity diseases. The discrimination based on B-cell-triggered IgE- immune responses remains difficult, conceivably by reason of the subclinical status of the subjects. Solely AspF3, which is already established in the Immuno-CAP-analysis, shows differential power.

6. Literaturverzeichnis

1. Killie, I., Development of new tissue culture protocols for enrichment of CD4 T cells associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. Master Thesis, University of Tromsø 2010. 2010.
2. Bharadwaj, M., N.A. Mifsud, and J. McCluskey, Detection and characterisation of alloreactive T cells. *Methods Mol Biol*, 2012. 882: p. 309-37.
3. van de Veerdonk, F.L., et al., *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 2017. 15: p. 661.
4. Park, S.J. and B. Mehrad, Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clinical microbiology reviews*, 2009. 22(4): p. 535-551.
5. Latge, J.P., *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 1999. 12(2): p. 310-50.
6. Brakhage, A.A. and K. Langfelder, Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annual review of microbiology*, 2002. 56: p. 433-55.
7. Chai, L.Y.A., et al., *Aspergillus fumigatus* conidial melanin modulates host cytokine response. *Immunobiology*, 2010. 215(11): p. 915-20.
8. Balloy, V. and M. Chignard, The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection*, 2009. 11(12): p. 919-27.
9. Agarwal, R., et al., Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 2013. 43(8): p. 850-73.
10. Boyle, K.B., L.R. Stephens, and P.T. Hawkins, Activation of the neutrophil NADPH oxidase by *Aspergillus fumigatus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012. 1273: p. 68-73.
11. Chaudhary, N., J.F. Staab, and K.A. Marr, Healthy human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* antigens. *PloS one*, 2010. 5(2): p. e9036.
12. Kwon-Chung, K.J. and J.A. Sugui, *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? *PLoS pathogens*, 2013. 9(12): p. e1003743-e1003743.
13. Salvatori, G. and S. Campo, Current understanding of PTX3 protective activity on *Aspergillus fumigatus* infection. *Medical mycology*, 2012. 50(3): p. 225-33.

14. Serrano-Gomez, D., J.A. Leal, and A.L. Corbi, DC-SIGN mediates the binding of *Aspergillus fumigatus* and keratinophylic fungi by human dendritic cells. *Immunobiology*, 2005. 210(2-4): p. 175-83.
15. Dewi, I.M.W., F.L. van de Veerdonk, and M.S. Gresnigt, The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 2017. 3(4).
16. Tai, Y., et al., Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in pharmacology*, 2018. 9: p. 642.
17. Anaya, J.-M., C.-T. P, and C. John, Major histocompatibility complex: Antigen processing presentation. 2013. p. 169-184.
18. Moretti, S., et al., A mast cell-ILC2-Th9 pathway promotes lung inflammation in cystic fibrosis. *Nature communications*, 2017. 8: p. 14017.
19. Potenza, L., et al., Characterization of specific immune responses to different *Aspergillus* antigens during the course of invasive Aspergillosis in hematologic patients. *PloS one*, 2013. 8(9): p. e74326.
20. Taniuchi, I., CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annual review of immunology*, 2018. 36: p. 579-601.
21. Vandenplas, O., Occupational asthma: etiologies and risk factors. *Allergy, asthma & immunology research*, 2011. 3(3): p. 157-67.
22. Hirahara, K. and T. Nakayama, CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International immunology*, 2016. 28(4): p. 163-71.
23. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology*, 2010. 28: p. 445-489.
24. Zelante, T., et al., CD103(+) Dendritic Cells Control Th17 Cell Function in the Lung. *Cell reports*, 2015. 12(11): p. 1789-801.
25. Porter, P.C., et al., Necessary and sufficient role for T helper cells to prevent fungal dissemination in allergic lung disease. *Infect Immun*, 2011. 79(11): p. 4459-71.
26. Bedke, T., et al., Distinct and complementary roles for *Aspergillus fumigatus*-specific Tr1 and Foxp3+ regulatory T cells in humans and mice. *Immunology and cell biology*, 2014. 92(8): p. 659-70.
27. Bacher, P. and A. Scheffold, Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A*, 2013. 83(8): p. 692-701.
28. Abbas Abul K, Lichtman Andrew H, and P. Shiv, *Cellular and Molecular Immunology*. 9th ed. 2017: Elsevier. 563.

29. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. B-cell activation by armed helper T cells. 5th ed. 2001, New York: Garland Science.
30. Kelly, L.M., et al., EB12 guides serial movements of activated B cells and ligand activity is detectable in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2011. 187(6): p. 3026-32.
31. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews Immunology*, 2005. 5(3): p. 230-42.
32. Looney, T.J., et al., Human B-cell isotype switching origins of IgE. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2016. 137(2): p. 579-586.e7.
33. Stavnezer, J., J.E.J. Guikema, and C.E. Schrader, Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology*, 2008. 26: p. 261-92.
34. Yoshida, K., et al., Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with *Nippostrongylus brasiliensis*: evidence for successive class switching from mu to epsilon via gamma 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. 87(20): p. 7829-33.
35. Del Prete, G., et al., IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 1988. 140(12): p. 4193-8.
36. Yang, Z., et al., Regulation of B cell fate by chronic activity of the IgE B cell receptor. *eLife*, 2016. 5.
37. Hohl, T.M. and M. Feldmesser, *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic cell*, 2007. 6(11): p. 1953-63.
38. Aalberse, R.C. and T.A.E. Platts-Mills, How do we avoid developing allergy: modifications of the TH2 response from a B-cell perspective. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2004. 113(5): p. 983-6.
39. Koch, A., et al., Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF-gamma and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, 2007. 125(2): p. 194-204.
40. McAleer, J.P. and A.T. Vella, Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity. *Critical reviews in immunology*, 2008. 28(4): p. 281-99.
41. Millner, P.D., et al., Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Applied and environmental microbiology*, 1977. 34(6): p. 765-72.

42. Wurster, S., et al., Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses*, 2017. 60(10): p. 668-675.
43. M. Recer, G., et al., Ambient air levels of *Aspergillus fumigatus* and thermophilic actinomycetes in a residential neighborhood near a yard-waste composting facility. Vol. 17. 2001.
44. Sanchez-Monedero, M.A., E.I. Stentiford, and S.T. Urpilainen, Bioaerosol generation at large-scale green waste composting plants. *Journal of the Air & Waste Management Association* (1995), 2005. 55(5): p. 612-8.
45. Williams, B., et al., Estimating *Aspergillus fumigatus* exposure from outdoor composting activities in England between 2005 and 14. *Waste management (New York, N Y)*, 2019. 84: p. 235-244.
46. Sabino, R., et al., The role of occupational *Aspergillus* exposure in the development of diseases. *Medical mycology*, 2019. 57(Supplement_2): p. S196-S205.
47. Thurston, J.R., et al., Histopathologic and antibody responses of rabbits exposed to aerosols containing spores of *Aspergillus fumigatus*: comparison of single and multiple exposures. *American journal of veterinary research*, 1986. 47(4): p. 919-23.
48. Lemieszek, M.K., et al., Age influence on mice lung tissue response to *Aspergillus fumigatus* chronic exposure. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 2015. 22(1): p. 69-75.
49. Schonheyder, H., et al., Serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in Danish farmers. *Sabouraudia*, 1985. 23(2): p. 93-9.
50. Pawankar, R., et al., WAO, white book on allergy. Vol. 52. 2012. 55-58.
51. Bozek, A. and K. Pyrkosz, Immunotherapy of mold allergy: A review. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 2017. 13(10): p. 2397-2401.
52. Mathias, C.B., Natural killer cells in the development of asthma. *Current allergy and asthma reports*, 2015. 15(2): p. 500.
53. Crameri, R., et al., Fungal allergies: a yet unsolved problem. *Chemical immunology and allergy*, 2006. 91: p. 121-33.
54. Simon-Nobbe, B., et al., The spectrum of fungal allergy. *International archives of allergy and immunology*, 2008. 145(1): p. 58-86.
55. Ghosh, S., S.A. Hoselton, and J.M. Schuh, Allergic Inflammation in *Aspergillus fumigatus*-Induced Fungal Asthma. *Current allergy and asthma reports*, 2015. 15(10): p. 59.

56. Denning, D.W., et al., The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *The European respiratory journal*, 2006. 27(3): p. 615-26.
57. Bongomin, F., et al., Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 2017. 3(4).
58. Kolodziejczyk, K., et al., The clinical differences of asthma in patients with molds allergy. *Pneumonologia i alergologia polska*, 2016. 84(2): p. 81-6.
59. Fairs, A., et al., IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is associated with reduced lung function in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2010. 182(11): p. 1362-8.
60. Ward, M.D.W., et al., A comparison of the allergic responses induced by *Penicillium chrysogenum* and house dust mite extracts in a mouse model. *Indoor air*, 2010. 20(5): p. 380-91.
61. Knutsen, A.P., et al., Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2012. 129(2): p. 280-91; quiz 292-3.
62. Chaudhary, N. and K.A. Marr, Impact of *Aspergillus fumigatus* in allergic airway diseases. *Clinical and translational allergy*, 2011. 1(1): p. 4.
63. Janeway, C.J., Travers, P., Walport, M., et al., *Allergy and Hypersensitivity, in Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 2001, Garland Science: New York.
64. Rajan, T.V., The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends in immunology*, 2003. 24(7): p. 376-9.
65. Xie, H. and S.-H. He, Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, 2005. 11(19): p. 2851-7.
66. Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls, TH17 cells in asthma and COPD. *Annual review of physiology*, 2010. 72: p. 495-516.
67. Soubani, A.O. and P.H. Chandrasekar, The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest*, 2002. 121(6): p. 1988-99.
68. Mohindra, S., R. Mehta, and A. Bal, ABPA Concomitantly Occurring with Invasive Sinus Aspergillosis: A Short Report on Two Patients. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery : official publication of the Association of Otolaryngologists of India*, 2014. 66(Suppl 1): p. 329-33.
69. Greenberger, P.A., Clinical aspects of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2003. 8: p. s119-27.

70. Denning, D.W., A. Pleuvry, and D.C. Cole, Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Medical mycology*, 2013. 51(4): p. 361-70.
71. Barac, A., et al., Chronic pulmonary aspergillosis update: A year in review. *Medical mycology*, 2019. 57(Supplement_2): p. S104-S109.
72. Zmeili, O.S. and A.O. Soubani, Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 2007. 100(6): p. 317-34.
73. Jabeen, K., Pulmonary infections after tuberculosis. *International journal of mycobacteriology*, 2016. 5 Suppl 1: p. S73.
74. Yeghen, T., et al., Management of invasive pulmonary aspergillosis in hematology patients: a review of 87 consecutive cases at a single institution. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2000. 31(4): p. 859-68.
75. Fukuda, T., et al., Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning. *Blood*, 2003. 102(3): p. 827-33.
76. Denning, D.W., Early diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet (London, England)*, 2000. 355(9202): p. 423-4.
77. Patterson, T.F., et al., Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2016. 63(4): p. e1-e60.
78. Shokouhi, S., S. Tehrani, and M. Hemmatian, Mixed Pulmonary Infection with *Penicillium notatum* and *Pneumocystis jiroveci* in a Patient with Acute Myeloid Leukemia. *Tanaffos*, 2016. 15(1): p. 53-6.
79. Allergen Nomenclature. [cited 2019 June 25]; Available from: www.allergen.org.
80. Romano, J., et al., Disruption of the *Aspergillus fumigatus* ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. *Microbiology (Reading, England)*, 2006. 152(Pt 7): p. 1919-28.
81. Bruneau, J.M., et al., Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis*, 2001. 22(13): p. 2812-23.
82. Arruda, L.K., et al., *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *The Journal of experimental medicine*, 1990. 172(5): p. 1529-32.

83. Rementeria, A., et al., Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista iberoamericana de micologia*, 2005. 22(1): p. 1-23.
84. Ok, M., et al., Immune responses of human immature dendritic cells can be modulated by the recombinant *Aspergillus fumigatus* antigen Asp f1. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 2009. 16(10): p. 1485-92.
85. Liu, H., et al., Functional convergence of gliP and asp f1 in *Aspergillus fumigatus* pathogenicity. *Virulence*, 2018. 9(1): p. 1062-1073.
86. Dasari, P., et al., Asp f2 From *Aspergillus fumigatus* Recruits Human Immune Regulators for Immune Evasion and Cell Damage. *Frontiers in immunology*, 2018. 9: p. 1635.
87. Vasilev, V.V., et al., Autoantibodies Against C3b-Functional Consequences and Disease Relevance. *Frontiers in immunology*, 2019. 10: p. 64.
88. Amich, J., et al., *Aspergillus fumigatus* survival in alkaline and extreme zinc-limiting environments relies on the induction of a zinc homeostasis system encoded by the *zrfC* and *asp f2* genes. *Eukaryotic cell*, 2010. 9(3): p. 424-37.
89. Kurup, V.P., et al., Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 2000. 30(7): p. 988-93.
90. Hillmann, F., et al., The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp f3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 33396.
91. Cramer, R., Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *International archives of allergy and immunology*, 1998. 115(2): p. 99-114.
92. Suh, M.-J., et al., Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus Fumigatus* conidial proteome. *Proteome science*, 2012. 10(1): p. 30.
93. Mayer, C., et al., Humoral and cell-mediated autoimmune reactions to human acidic ribosomal P2 protein in individuals sensitized to *Aspergillus fumigatus* P2 protein. *The Journal of experimental medicine*, 1999. 189(9): p. 1507-12.
94. Farnell, E., et al., Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates. *Fungal biology*, 2012. 116(9): p. 1003-12.
95. Behnsen, J., et al., Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infection and immunity*, 2010. 78(8): p. 3585-94.

96. Wartenberg, D., et al., Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a major secreted protein. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 2011. 301(7): p. 602-11.
97. Jatou-Ogay, K., et al., Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology*, 1994. 14(5): p. 917-28.
98. Kauffman, H.F., et al., Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2000. 105(6 Pt 1): p. 1185-93.
99. Schutte, M., et al., Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PloS one*, 2009. 4(8): p. e6625.
100. Chauvin, D., et al., Targeting *Aspergillus fumigatus* Crf Transglycosylases With Neutralizing Antibody Is Relevant but Not Sufficient to Erase Fungal Burden in a Neutropenic Rat Model. *Frontiers in microbiology*, 2019. 10: p. 600.
101. Ok, M., et al., Immune responses of human immature dendritic cells can be modulated by the recombinant *Aspergillus fumigatus* antigen Asp f1. *Clin Vaccine Immunol*, 2009. 16(10): p. 1485-92.
102. Jolink, H., et al., Characterization of the T-cell-mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins Crf1 and catalase 1 in healthy individuals. *The Journal of infectious diseases*, 2013. 208(5): p. 847-56.
103. Cramer, R., et al., Structural aspects and clinical relevance of *Aspergillus fumigatus* antigens/allergens. *Medical mycology*, 2006. 44(Supplement_1): p. S261-S267.
104. Banerjee, B., et al., Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 2001. 31(5): p. 761-70.
105. Sriranganadane, D., et al., Secreted glutamic protease rescues aspartic protease Pep deficiency in *Aspergillus fumigatus* during growth in acidic protein medium. *Microbiology (Reading, England)*, 2011. 157(Pt 5): p. 1541-50.
106. Takahashi, N., T. Hayano, and M. Suzuki, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 1989. 337(6206): p. 473-5.
107. Glaser, A.G., et al., Analysis of the cross-reactivity and of the 1.5 Å crystal structure of the *Malassezia sympodialis* Mala s 6 allergen, a member of the cyclophilin pan-allergen family. *The Biochemical journal*, 2006. 396(1): p. 41-9.

108. Abad, A., et al., What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista iberoamericana de micologia*, 2010. 27(4): p. 155-82.
109. Shen, H.D., et al., Identification of vacuolar serine proteinase as a major allergen of *Aspergillus fumigatus* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 2001. 31(2): p. 295-302.
110. Yeh, C.C., et al., Vacuolar Serine Protease Is a Major Allergen of *Fusarium proliferatum* and an IgE-Cross Reactive Pan-Fungal Allergen. *Allergy, asthma & immunology research*, 2016. 8(5): p. 438-44.
111. Knight, D.A., et al., Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2001. 108(5): p. 797-803.
112. Reed, C.E. and H. Kita, The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2004. 114(5): p. 997-1008; quiz 1009.
113. Shen, H.-D., et al., *Aspergillus* and *Penicillium* allergens: focus on proteases. *Current allergy and asthma reports*, 2007. 7(5): p. 351-6.
114. Yuen, K.Y., et al., Characterization of AFMP1: a novel target for serodiagnosis of aspergillosis. *Journal of clinical microbiology*, 2001. 39(11): p. 3830-7.
115. Woo, P.C.Y., et al., Mp1p homologues as virulence factors in *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology*, 2018. 56(3): p. 350-360.
116. Woo, P.C.Y., et al., Detection of cell wall galactomannoprotein Afmp1p in culture supernatants of *Aspergillus fumigatus* and in sera of aspergillosis patients. *Journal of clinical microbiology*, 2002. 40(11): p. 4382-7.
117. Denikus, N., et al., Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis. *Infection and immunity*, 2005. 73(8): p. 4704-13.
118. Cagas, S.E., et al., Profiling the *Aspergillus fumigatus* proteome in response to caspofungin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011. 55(1): p. 146-54.
119. Yadav, R.K. and P.K. Shukla, A novel monoclonal antibody against enolase antigen of *Aspergillus fumigatus* protects experimental aspergillosis in mice. *FEMS microbiology letters*, 2019. 366(3).
120. Petrov, A., A. Meskauskas, and J.D. Dinman, Ribosomal protein L3: influence on ribosome structure and function. *RNA biology*, 2004. 1(1): p. 59-65.

121. Saxena, S., et al., cDNA cloning, expression and characterization of an allergenic L3 ribosomal protein of *Aspergillus fumigatus*. *Clinical and experimental immunology*, 2003. 134(1): p. 86-91.
122. Leal, S.M., Jr., et al., Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *The Journal of clinical investigation*, 2012. 122(7): p. 2482-98.
123. Si, H., et al., Morphogenetic and developmental functions of the *Aspergillus nidulans* homologues of the yeast bud site selection proteins Bud4 and Axl2. *Molecular microbiology*, 2012. 85(2): p. 252-70.
124. Glaser, A.G., et al., Molecular and immunological characterization of Asp f 34, a novel major cell wall allergen of *Aspergillus fumigatus*. *Allergy*, 2009. 64(8): p. 1144-51.
125. Melin, P., J. Schnurer, and E.G.H. Wagner, Characterization of phiA, a gene essential for phialide development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 2003. 40(3): p. 234-41.
126. Shibuya, K., et al., Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology*, 2006. 47(4): p. 249-55.
127. Domer, J.E. and G.S. Kobayashi, *Human Fungal Pathogens*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
128. Kavanagh, K., *New Insights in Medical Mycology*. 2007: Springer Netherlands.
129. Voltersen, V., et al., Proteome Analysis Reveals the Conidial Surface Protein CcpA Essential for Virulence of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *mBio*, 2018. 9(5).
130. Lind, A.L., et al., An LaeA- and BrlA-Dependent Cellular Network Governs Tissue-Specific Secondary Metabolism in the Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere*, 2018. 3(2).
131. Bauer, B., et al., Characterisation of the CipC-like protein AFUA_5G09330 of the opportunistic human pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses*, 2010. 53(4): p. 296-304.
132. Melin, P., J. Schnurer, and E.G. Wagner, Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* reveals proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Mol Genet Genomics*, 2002. 267(6): p. 695-702.
133. Canela, H.M., L.A. Takami, and M.E. da Silva Ferreira, cipC is important for *Aspergillus fumigatus* virulence. *APMIS*, 2017. 125(2): p. 141-147.

134. Beck, J., et al., Characterization of the *Aspergillus fumigatus* chitosanase CsnB and evaluation of its potential use in serological diagnostics. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 2014. 304(5-6): p. 696-702.
135. Chen, X., et al., High-level expression and characterization of a highly thermostable chitosanase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters*, 2012. 34(4): p. 689-94.
136. Levdansky, E., et al., The *Aspergillus fumigatus* cspA gene encoding a repeat-rich cell wall protein is important for normal conidial cell wall architecture and interaction with host cells. *Eukaryotic cell*, 2010. 9(9): p. 1403-15.
137. Fan, Z., et al., cspA influences biofilm formation and drug resistance in pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *BioMed research international*, 2015. 2015: p. 960357.
138. Hartl, L., et al., Characterization of the GPI-anchored endo beta-1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 2011. 48(2): p. 185-91.
139. Latge, J.P., et al., Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology*, 2005. 43 Suppl 1: p. S15-22.
140. Al-Shami, A., et al., Integrin-alpha FG-GAP repeat-containing protein 2 is critical for normal B cell differentiation and controls disease development in a lupus model. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 2013. 191(7): p. 3789-98.
141. Zhao, W., et al., N-Glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall beta-glucan synthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology*, 2013. 23(8): p. 955-68.
142. Beck, J. and F. Ebel, Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 2013. 303(2): p. 90-7.
143. Jedd, G. and N.H. Chua, A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature cell biology*, 2000. 2(4): p. 226-31.
144. Beck, J., B. Echtenacher, and F. Ebel, Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous Ascomycota. *Molecular microbiology*, 2013. 89(5): p. 857-71.
145. Beck, J., B. Echtenacher, and F. Ebel, The HexA protein of *Aspergillus fumigatus* and its role in stress resistance and virulence. 2011. 11-11.
146. Kamei, K., et al., [Culture filtrate of *Aspergillus fumigatus* and its cytotoxic activity against leukocytes]. *Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology*, 2002. 43(3): p. 163-6.
147. Kumagai, T., et al., Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of the Asp-hemolysin-related synthetic peptides from *Aspergillus fumigatus*. *Biological &*

- pharmaceutical bulletin, 2006. 29(11): p. 2181-6.
148. Pech, M.A., et al., [Modified LDL and atherosclerosis. Nature of modifications. Physicochemical and biological properties]. LDL modifiées et atherosclerose. Nature des modifications. Propriétés physicochimiques et biologiques. Annales de biologie clinique, 1992. 50(4): p. 213-27.
 149. Blachowicz, A., et al., Proteomic characterization of *Aspergillus fumigatus* isolated from air and surfaces of the International Space Station. Fungal genetics and biology : FG & B, 2019. 124: p. 39-46.
 150. Owens, R.A., et al., A proteomic approach to investigating gene cluster expression and secondary metabolite functionality in *Aspergillus fumigatus*. PloS one, 2014. 9(9): p. e106942.
 151. Grahl, N., et al., *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. Molecular microbiology, 2012. 84(2): p. 383-99.
 152. Kastanos, E.K., Y.Y. Woldman, and D.R. Appling, Role of mitochondrial and cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase isozymes in de novo purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry, 1997. 36(48): p. 14956-64.
 153. Bacher, P., et al., Identification of Immunogenic Antigens from *Aspergillus fumigatus* by Direct Multiparameter Characterization of Specific Conventional and Regulatory CD4⁺ T Cells. The Journal of Immunology, 2014. 193(7): p. 3332-3343.
 154. Page, L., et al., CcpA- and Shm2-Pulsed Myeloid Dendritic Cells Induce T-Cell Activation and Enhance the Neutrophilic Oxidative Burst Response to *Aspergillus fumigatus*. Frontiers in Immunology, 2021. 12.
 155. Aalberse, R.C., J. Akkerdaas, and R. van Ree, Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. Allergy, 2001. 56(6): p. 478-90.
 156. Dall'Antonia, F., et al., Prediction of IgE-binding epitopes by means of allergen surface comparison and correlation to cross-reactivity. The Journal of allergy and clinical immunology, 2011. 128(4): p. 872-879.e8.
 157. Aalberse, R.C., Structural biology of allergens. The Journal of allergy and clinical immunology, 2000. 106(2): p. 228-38.
 158. Fukutomi, Y., et al., Serological diagnosis of allergic bronchopulmonary mycosis: Progress and challenges. Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology, 2016. 65(1): p. 30-6.

159. Bacher, P., et al., Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell*, 2019. 176(6): p. 1340-1355.e15.
160. Cramer, R., et al., Cross-reactivity among fungal allergens: a clinically relevant phenomenon? *Mycoses*, 2009. 52(2): p. 99-106.
161. Schnack, E., Herstellung rekombinanter Proteine für die Entwicklung T-Zell-basierter Diagnostikverfahren für den Nachweis von Erkrankungen, die durch den pathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ausgelöst werden, in LMU München. 2020.
162. Leite, G.M., N. Magan, and A. Medina, Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: an optimized method for filamentous fungi. *Journal of microbiological methods*, 2012. 88(3): p. 413-8.
163. Scharf, S., et al., Introduction of a bead beating step improves fungal DNA extraction from selected patient specimens. *International Journal of Medical Microbiology*, 2020. 310(6): p. 151443.
164. Rossi, O., et al., Comparison of colorimetric assays with quantitative amino acid analysis for protein quantification of Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMAs). *Mol Biotechnol*, 2015. 57(1): p. 84-93.
165. Legler, G., et al., On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Anal Biochem*, 1985. 150(2): p. 278-87.
166. Al-Tubuly, A.A., SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods in molecular medicine*, 2000. 40: p. 391-405.
167. Kleiveland, C.R., Peripheral Blood Mononuclear Cells, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 161-167.
168. Lauruschkat, C.D., et al., Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. *Mycoses*, 2018. 61(8): p. 549-560.
169. Czerkinsky, C.C., et al., A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods*, 1983. 65(1-2): p. 109-21.
170. Chen, L.M., et al., Comparison of nitrocellulose and PVDF membranes in GTP-overlay assay and western blot analysis. *BioTechniques*, 1994. 16(4): p. 600-1.
171. Gershoni, J.M. and G.E. Palade, Protein blotting: principles and applications. *Analytical biochemistry*, 1983. 131(1): p. 1-15.
172. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. 76(9): p. 4350-4.
173. van Hage, M., C. Hamsten, and R. Valenta, ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 2017. 140(4): p. 974-977.
 174. Testprinzip ImmunoCAP Spezifisches IgE. [cited 2020 06.05.2020]; Available from: <http://www.phadia.com/de/4/Produkte/Tests/1/Testprinzip-ImmunoCAP-Spezifisches-IgE/>.
 175. Adamson, T.W., et al., Hypothermic endpoint for an intranasal invasive pulmonary aspergillosis mouse model. *Comparative medicine*, 2013. 63(6): p. 477-81.
 176. Kurup, V.P., et al., Specific antibodies to recombinant allergens of *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients with ABPA. *Clinical and molecular allergy : CMA*, 2006. 4: p. 11.
 177. Kurup, V.P., et al., Purified recombinant *A. fumigatus* allergens induce different responses in mice. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, 2001. 98(3): p. 327-36.
 178. Lipopolysaccharides. 08.04.2021]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/lipopolysaccharides.html>.
 179. Romani, L., Immunity to fungal infections. *Nature reviews Immunology*, 2011. 11(4): p. 275-88.
 180. Sorrenti, V., et al., Reference Values for a Panel of Cytokinergic and Regulatory Lymphocyte Subpopulations. *Immune Netw*, 2016. 16(6): p. 344-357.
 181. Verma, A., et al., Adaptive immunity to fungi. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2014. 5(3): p. a019612.
 182. Barwick, B.G., et al., B cell activation and plasma cell differentiation are inhibited by de novo DNA methylation. *Nature communications*, 2018. 9(1): p. 1900.
 183. He, J.-S., et al., Biology of IgE production: IgE cell differentiation and the memory of IgE responses. *Current topics in microbiology and immunology*, 2015. 388: p. 1-19.
 184. Hanns-Wolf Baenkler, H.G., Johannes-Martin Hahn, Martin Hinterseer, Andreas Knez, *Kurzlehrbuch Innere Medizin*. 2 ed. 2015: Georg Thieme Verlag.
 185. Protein A/G Affinity. 29.10.2020]; Available from: <https://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/protein-g-affinity?ID=LUSMML97Q>.
 186. Page, L., et al., Evaluation of *Aspergillus* and *Mucorales* specific T-cells and peripheral blood mononuclear cell cytokine signatures as biomarkers of environmental mold exposure. *International Journal of Medical Microbiology*, 2018. 308(8): p. 1018-1026.
 187. Klimek-Ochab, M., et al., Comparative study of fungal cell disruption--scope and limitations of the methods. *Folia microbiologica*, 2011. 56(5): p. 469-75.

188. Starke, R., et al., Incomplete cell disruption of resistant microbes. *Scientific reports*, 2019. 9(1): p. 5618.
189. Bond, J.S. and P.E. Butler, Intracellular proteases. *Annual review of biochemistry*, 1987. 56: p. 333-64.
190. Middelberg, A.P., Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology advances*, 1995. 13(3): p. 491-551.
191. Shehadul Islam, M., A. Aryasomayajula, and P.R. Selvaganapathy, A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines (Basel)*, 2017. 8(3).
192. Santamaria, P., et al., Involvement of class II MHC molecules in the LPS-induction of IL-1/TNF secretions by human monocytes. Quantitative differences at the polymorphic level. *The Journal of Immunology*, 1989. 143(3): p. 913-922.
193. Molvig, J., et al., Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumour necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scandinavian journal of immunology*, 1988. 27(6): p. 705-16.
194. Bacher, P., et al., Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell*, 2016. 167(4): p. 1067-1078.e16.
195. Lauruschkat, C.D., et al., Chronic Occupational Mold Exposure Drives Expansion of Aspergillus-Reactive Type 1 and Type 2 T-Helper Cell Responses. *J Fungi (Basel)*, 2021. 7(9).
196. Dasari, P., et al., Enolase From *Aspergillus fumigatus* Is a Moonlighting Protein That Binds the Human Plasma Complement Proteins Factor H, FHL-1, C4BP, and Plasminogen. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 2573.
197. Calera, J.A., et al., Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, 1997. 65(11): p. 4718-24.
198. Teixeira, L.K., et al., The role of interferon-g on immune and allergic responses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2005. 100: p. 137-144.
199. Chang, W.S., et al., Age-Related Changes in Immunological Factors and Their Relevance in Allergic Disease Development During Childhood. *Allergy, asthma & immunology research*, 2016. 8(4): p. 338-45.
200. Moss, R.B., Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med Mycol*, 2005. 43 Suppl 1: p. S203-6.
201. Becker, K.L., et al., Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients. *Clin Exp Allergy*, 2015. 45(2): p. 423-37.

202. Lauruschkat, C.D., et al., Development of a Simple and Robust Whole Blood Assay with Dual Co-Stimulation to Quantify the Release of T-Cellular Signature Cytokines in Response to *Aspergillus fumigatus* Antigens. *Journal of Fungi*, 2021. 7(6): p. 462.
203. Manni, M.L., K.M. Robinson, and J.F. Alcorn, A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection. *Expert Rev Respir Med*, 2014. 8(1): p. 25-42.
204. Zhang, Z., T. Reponen, and G.K.K. Hershey, Fungal Exposure and Asthma: IgE and Non-IgE-Mediated Mechanisms. *Current allergy and asthma reports*, 2016. 16(12): p. 86.
205. Bayrak Degirmenci, P., et al., Allergic Rhinitis and Its Relationship with IL-10, IL-17, TGF- β , IFN- γ , IL 22, and IL-35. *Dis Markers*, 2018. 2018: p. 9131432.
206. Giacalone, V.D., et al., Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for Homeostasis and Disease. *International journal of molecular sciences*, 2020. 21(3): p. 851.
207. Lindén, A., M. Laan, and G.P. Anderson, Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J*, 2005. 25(1): p. 159-72.
208. Deo, S.S., et al., Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India : official organ of Indian Chest Society*, 2010. 27(2): p. 66-71.
209. Liu, S., et al., Prevalence and Risk Factors for Farmer's Lung in Greenhouse Farmers: An Epidemiological Study of 5,880 Farmers from Northeast China. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2015. 71(2): p. 1051-1057.
210. Remes, S.T., et al., Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children? *Clinical & Experimental Allergy*, 2003. 33(4): p. 427-434.
211. Viinanen, A., et al., Prevalence of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and allergic sensitization in Mongolia. *Allergy*, 2005. 60(11): p. 1370-7.
212. Barnes, M., et al., Crete: does farming explain urban and rural differences in atopy? *Clin Exp Allergy*, 2001. 31(12): p. 1822-8.
213. Addo Yobo, E.O., et al., Exercise induced bronchospasm in Ghana: differences in prevalence between urban and rural schoolchildren. *Thorax*, 1997. 52(2): p. 161-165.
214. Rodriguez, A., et al., Urbanisation and asthma in low-income and middle-income countries: a systematic review of the urban-rural differences in asthma prevalence. *Thorax*, 2019. 74(11): p. 1020-1030.
215. Eduard, W., et al., Do farming exposures cause or prevent asthma? Results from a study of adult Norwegian farmers. *Thorax*, 2004. 59(5): p. 381-386.
216. Joshi, S., et al., 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(17): p. 3653-69.

217. Lemire, J.M., et al., Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃: preferential inhibition of Th1 functions. *The Journal of nutrition*, 1995. 125 6 Suppl: p. 1704S-1708S.
218. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, T cell development and receptor diversity during aging. *Current opinion in immunology*, 2005. 17(5): p. 468-75.
219. Weng, N.P., Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity*, 2006. 24(5): p. 495-9.
220. Salam, N., et al., T cell ageing: effects of age on development, survival & function. *The Indian journal of medical research*, 2013. 138(5): p. 595-608.
221. Allman, D. and J.P. Miller, B cell development and receptor diversity during aging. *Current opinion in immunology*, 2005. 17(5): p. 463-7.
222. Hjalgrim H, F.J., Melbye M, The epidemiology of EBV and its association with malignant disease, in *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, C.-F.G. Arvin A, Mocarski E, et al., Editor. 2007, Cambridge University Press: Cambridge.
223. Cardenas Sierra, D., et al., Age-associated Epstein-Barr virus-specific T cell responses in seropositive healthy adults. *Clinical and experimental immunology*, 2014. 177(1): p. 320-32.
224. Priyamvada, H., et al., Seasonal variation of the dominant allergenic fungal aerosols - One year study from southern Indian region. *Scientific reports*, 2017. 7(1): p. 11171.
225. de Ana, S.G., et al., Seasonal distribution of *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Penicillium* species isolated in homes of fungal allergic patients. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 2006. 16(6): p. 357-63.
226. Jawa, V., et al., T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: Preclinical assessment and mitigation. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*, 2013. 149(3): p. 534-55.
227. Monoclonal Antibodies Detecting Human Antigens: CD28/CD49d. 2017 19.06.2022]; Available from: [https://www.bdbiosciences.com/content/bdb/paths/generate-tds-document.de.347690.pdf](https://wwwbdbiosciences.com/content/bdb/paths/generate-tds-document.de.347690.pdf).
228. Mallone, R., et al., Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clinical and experimental immunology*, 2011. 163(1): p. 33-49.

229. Schmidt, T., et al., Comparative analysis of assays for detection of cell-mediated immunity toward cytomegalovirus and *M. tuberculosis* in samples from deceased organ donors. *Am J Transplant*, 2014. 14(9): p. 2159-67.
230. Doberne, D., R.L. Gaur, and N. Banaei, Preanalytical Delay Reduces Sensitivity of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay for Detection of Latent Tuberculosis Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011. 49(8): p. 3061-3064.
231. Tanguay, S. and J.J. Killion, Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells. *Lymphokine Cytokine Res*, 1994. 13(4): p. 259-63.
232. Zukiewicz-Sobczak, W.A., The role of fungi in allergic diseases. *Postepy dermatologii i alergologii*, 2013. 30(1): p. 42-5.
233. Havaux, X., et al., A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. *Clinical and experimental immunology*, 2005. 139(2): p. 179-88.
234. Kustrzeba-Wojcicka, I., et al., *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 2014. 47(3): p. 354-65.
235. Maezawa, Y., et al., IgE-dependent enhancement of Th2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Clinical and experimental immunology*, 2004. 135(1): p. 12-18.
236. Bush, A., Kids, Difficult Asthma and Fungus. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 2020. 6(2): p. 55.
237. Armstrong-James, D., et al., Confronting and mitigating the risk of COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. *The European respiratory journal*, 2020. 56(4): p. 2002554.
238. Abdalla, S., et al., Fatal Coronavirus Disease 2019-associated Pulmonary Aspergillosis; A Report of Two Cases and Review of the Literature. *IDCases*, 2020. 22: p. e00935-e00935.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

<i>Alternaria alternata</i>	<i>A. alternata</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A. fumigatus</i>
Allergische bronchopulmonale Aspergillose	ABPA
Antikörper	AK
Alkalische Phosphatase	AP
Antigen-präsentierende Zelle	APZ
Allergene des <i>A. fumigatus</i>	Aspf
Adenosintriphosphat	ATP
Bovines Serumalbumin	BSA
<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>C. herbarum</i>
COVID-19-assoziierte pulmonale Aspergillose	CAPA
Katalase	Cat
Konidienzellwandprotein (<i>conidial cell wall protein</i>)	Ccp
Unterscheidungsgruppen (<i>cluster of differentiation</i>)	CD
Konfidenzintervall	CI
Concanamycin A induziertes Protein C	CipC
Zytomegalievirus	CMV
Chronisch-nekrotische Aspergillose	CNA
Kohlenstoffdioxid	CO₂
Chronisch-obstruktive pulmonale Erkrankung	COPD
Corona Virus Disease 2019	COVID-19
Chronisch-pulmonale Aspergillose	CPA
Chitosanase	Csn
Oberflächenzellprotein A (<i>cell surface protein A</i>)	CspA
Zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic t-lymphocytes</i>)	CTL
Cellular Technology Limited	CTL
Jahr „verlorener“ Gesundheit (<i>disability adjusted life year</i>)	DALY
Verdünnungspuffer (<i>dilution buffer</i>)	DB

Dendritische Zellen spezifisches ICAM3-greifendes nicht-Integrin	DC-SIGN
Dendritische Zellen	DZ
Epstein-Barr Virus	EBV
Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionstest	ELISA
Enzym-gekoppelter Immunospot-Adsorptionstest	ELISpot
Endo- β -1,3-Glucanase	Eng
Endotoxin-Einheiten	EU
Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	FACS
Fötale Kälberserum	FCS
<i>False-positive detection rate</i>	FDR
Phenylalanyl-Glycyl-Glycyl-Alanyl-Prolyl	FG-GAP
Faktor H	FH
Faktor H- Ligand	FHL
Faktor H- Rezeptor	FHR
β -1,3-Glucanosyltransferase	Gel1
Glycosylphosphatidylinositol-Anker	GPI-Anker
Hank's Balanced Salt Solution (Hanks Salzlösung)	HBSS
<i>Hexagonal peroxisome protein</i>	HexA
Hämolysin	Hly
Hitzeschockprotein	Hsp
Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 3	ICAM3
Interferon	IFN
Immunglobulin E	IgE
Interleukin	IL
Invasive pulmonale Aspergillose	IPA
Lipopolysaccharide	LPS
Monoklonaler Antikörper	mAb
Manganase-Superoxiddismutase	MnSOD
<i>Major histocompatibility complex</i>	MHC
Nicotinamidadenindinukleotid	NADH
<i>Neutrophil extracellular trap</i>	NET
Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne	NOD

<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>P. chrysogenum</i>
Pathogen-assoziiertes molekulares Muster	PAMP
Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts	PBMC
Phosphat-Puffer-Lösung	PBS
Polykettenreaktion	PCR
<i>Protoplast secreted protein</i>	Pst2
Aspf10, Aspergillopepsin	PEP
Peptidyl-Prolyl-Isomerase	PPIase
Pathogen-Erkennungs-Rezeptor (<i>pathogen recognition receptor</i>)	PRR
Polyvinylidenfluorid	PVDF
Reaktive Sauerstoffspezies	ROS
Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)	RPM
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium,	RPMI-1640
Hydrogencarbonatpuffersystem	
Raumtemperatur	RT
Schweres Asthma mit Pilz-Sensibilisierung	SAFS
Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	SDS PAGE
<i>Spot-forming-Cells</i>	SFCs
Tris-gepufferte Kochsalzlösung	TBS
Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20	TBST
Tumor-Wachstumsfaktor	TGF
Tris-Glycin-Natriumdodecylsulfat	TGS
T-Helfer-Zelle	T_H-Zelle
Toll-Like-Rezeptor	TLR
Tumor-Nekrosefaktor	TNF
Typ-1-regulatorische T-Zellen	Tr1
Weitere regulatorische T-Zellen	Treg
T-Zell-Rezeptor	TZR
Vollentsalztes Wasser	VE Wasser
Weltgesundheitsorganisation	WHO

II Abbildungsverzeichnis

1: Aktivierung naiver T-Zellen zu spezifischen T _H -Zellen durch Antigenpräsentation [3]	3
2: <i>A. fumigatus</i> -Infektion: angeborene Immunabwehr und T-Zell-Antworten [3].	3
3: Pathogenetisches T-Helfer-Populations-Krankheitsauslöser-Modell [22].	5
4: T _H -Zell- vermittelte Aktivierung von B-Zellen [3].	6
5: Typen der Hypersensitivität nach Gell und Coombs [63]	10
6: Klinisches Spektrum der pulmonalen Aspergillose [67].	12
7: PBMC-Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation [2]	32
8: Funktionsweise des 1-schrittigen ELISpots [1].	33
9: Vorbereitung der ELISpot-Analyse.	34
10: Auswertung des ELISpots durch Zählung der Zytokinhöfe.	35
11: IgE-Messung im Western Blot	37
12: Morphologisches Aussehen der <i>Ascomycota</i> auf Bierwürz-Agarplatten	38
13: Proteinkonzentration im Zeitverlauf des Lysevorgangs je Pilz.	39
14: Proteinkonzentration im Zeitverlauf des Lysevorgangs für <i>C. herbarum</i> .	39
15: Proteinkonzentration des <i>Penicillium</i> -Lysats vor und nach Filtration in Abhängigkeit von der <i>Bead-Beating</i> -Dauer	40
16: Vergleich der Proteinkonzentrationen der <i>Ascomycota</i> -Lysate vor und nach Filtration mit 0,20 µm Spritzenvorsatzfilter	41
17: Vitalitätstest der sterilfiltrierten Hyphenlysate der <i>Ascomycota</i> auf Abklatschplatten	41
18: Coomassie-Gel für sichtbare Aufteilung der Antigene als Banden auf dem Gel in Hinblick auf die Western Blot- Analyse.	44
19: Einfluss des Zeitpunktes des Ausplattierens auf die Messergebnisse im ELISpot-Versuch für A) IFN-γ, B) IL-5 und C) IL-17A	45
20: Auswirkungen von LPS auf die T-Zellantwort im IFN-γ- (A), IL-5-(B) und IL-17-ELISpot (C)	47
21: LPS-abhängige T-Zellevents für den Spender/ die Spenderin D3	48
22: PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T _H 1- (IFN-γ) -Antworten auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte	51

<u>23:</u> PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T _H 1- (IFN- γ) -Antworten auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte, AspF 22, CatB und CipC mit höchstem Signifikanzniveau.....	52
<u>24:</u> PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T _H 2- (IL-5) -Antworten auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte	53
<u>25:</u> PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T _H 2- (IL-5) -Antworten auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte, AspF 22, CatB, CipC und Hly mit höchstem Signifikanzniveau.....	54
<u>26:</u> Wertetabelle für die relevantesten Allergene im Rahmen der Differenzierung zwischen beruflich Exponierten und nicht beruflich exponierten Probanden/-innen.....	55
<u>27:</u> PBMCs von Biolandwirten/-innen zeigen erhöhte T _H 17- (IL-17A) -Antworten auf <i>A. fumigatus</i> -Antigene im Vergleich zur nicht beruflich exponierten Kontrollkohorte	55
<u>28:</u> Verhältnis der T _H 2-Antwort zur T _H 1-Antwort mittels der Signaturzytokine IL-5 und IFN- γ anhand der bisher wegweisenden Antigene AspF22, CatB und CipC.....	56
<u>29:</u> Verhältnis der T _H 2-Antwort zur T _H 1-Antwort für Crf1 mittels der Signaturzytokine IL-5 und IFN- γ	57
<u>30:</u> Verhältnis der T _H 17-Antwort zur T _H 1-Antwort mittels der Signaturzytokine IL-17A und IFN- γ anhand der statistisch relevantesten Antigene AspF4, Crf1 und AspF22.....	58
<u>31:</u> Vergleich von Nitrocellulose-Membran und PVDF-Membran.....	59
<u>32:</u> Vergleich von Blocken über Nacht bei 4°C und Seruminkubation über Nacht bei 4°C	60
<u>33:</u> Vergleich verschiedener Konditionen für die Blockierung mit BSA.....	60
<u>34:</u> IgE-Western Blot von 2 hochexponierten Blutspendern/-innen	61
<u>35:</u> Optimale Menge des zu verwendenden Serums.....	61
<u>36:</u> Vergleich der Banden bei 5 μ g bzw. 1 μ g Antigen anhand der Seren von 2 hochexponierten Blutspendern/-innen.....	62
<u>37:</u> IgE-AK-Profil für <i>A. fumigatus</i> -spezifische Antigene bei Biolandwirten/-innen und Kontrollen.....	63
<u>38:</u> IgE-AK-Profil für <i>A. fumigatus</i> -spezifische Antigene bei Biolandwirten/-innen und Kontrollen.....	64
<u>39:</u> In Image-Lab 5.0 eingelesene Western-Blots der 5 nicht-beruflich exponierten Kontrollen mit niedriger Umweltexposition	

40: In Image-Lab 5.0 eingelesene Western-Blots der 5 nicht-beruflich exponierten Kontrollen mit hoher Umweltexposition.....

41: In Image-Lab 5.0 eingelesene Western-Blots der 11 beruflich exponierten Probanden/-innen.....

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: aktuell in der Wissenschaft bekannte *A. fumigatus*-Antigene 14

Tabelle 2: Demographische Charakteristika der Studienteilnehmer/-innen.....31

Tabelle 3: Konzentration der verwendeten Antigene und Lysate.....42

Tabelle 4: LPS-Gehalt der für die Studie vorhergesehenen Antigene und Lysate 49

Anhang: Western Blot - Imaging

A. fumigatus-IgE-Western Blots: Kontrollkohorte (*Low-Spender/-innen*)

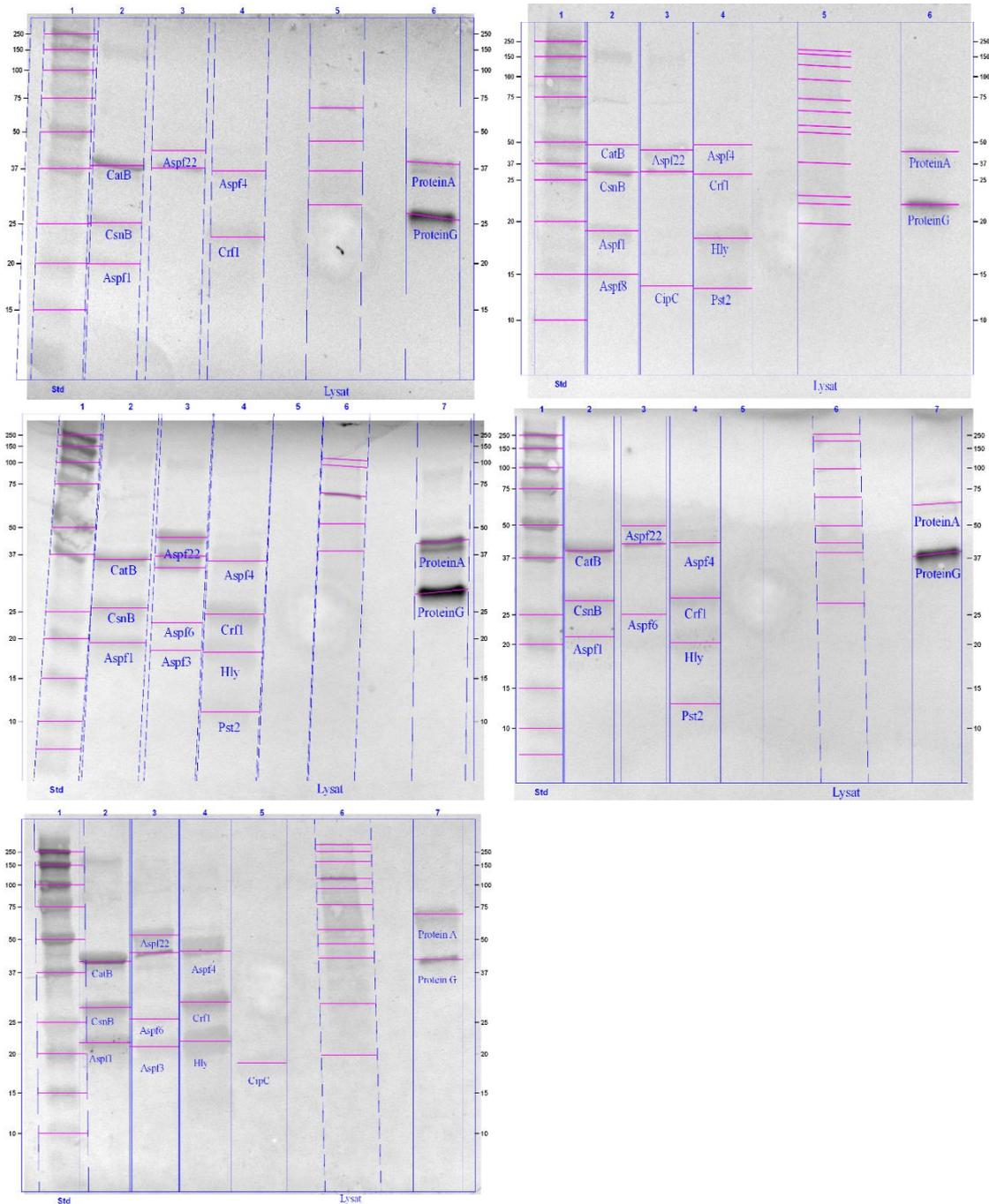


Abbildung 39: In Image-Lab 5.0 eingeleasene Western-Blots der 5 nicht-beruflich exponierten Kontrollen mit niedriger Umweltexposition. Lane 1 mit standardisierten Molekulargesichtsmarkern, Lane 6 bzw. 7 mit Protein A und G zur Positivkontrolle. Es wurden 12 Antigene und das myzeliale Lysat getestet, wobei nur Banden bei vorhandenen IgE-AK gegen das getestete Antigen sichtbar werden. Manuelle Beschriftung der detektierten Banden. Anhand dieser Aufnahmen wurden die Bandenintensitäten ausgelesen.

A. fumigatus-IgE-Western Blots: Kontrollkohorte (*High-Spender/-innen*)

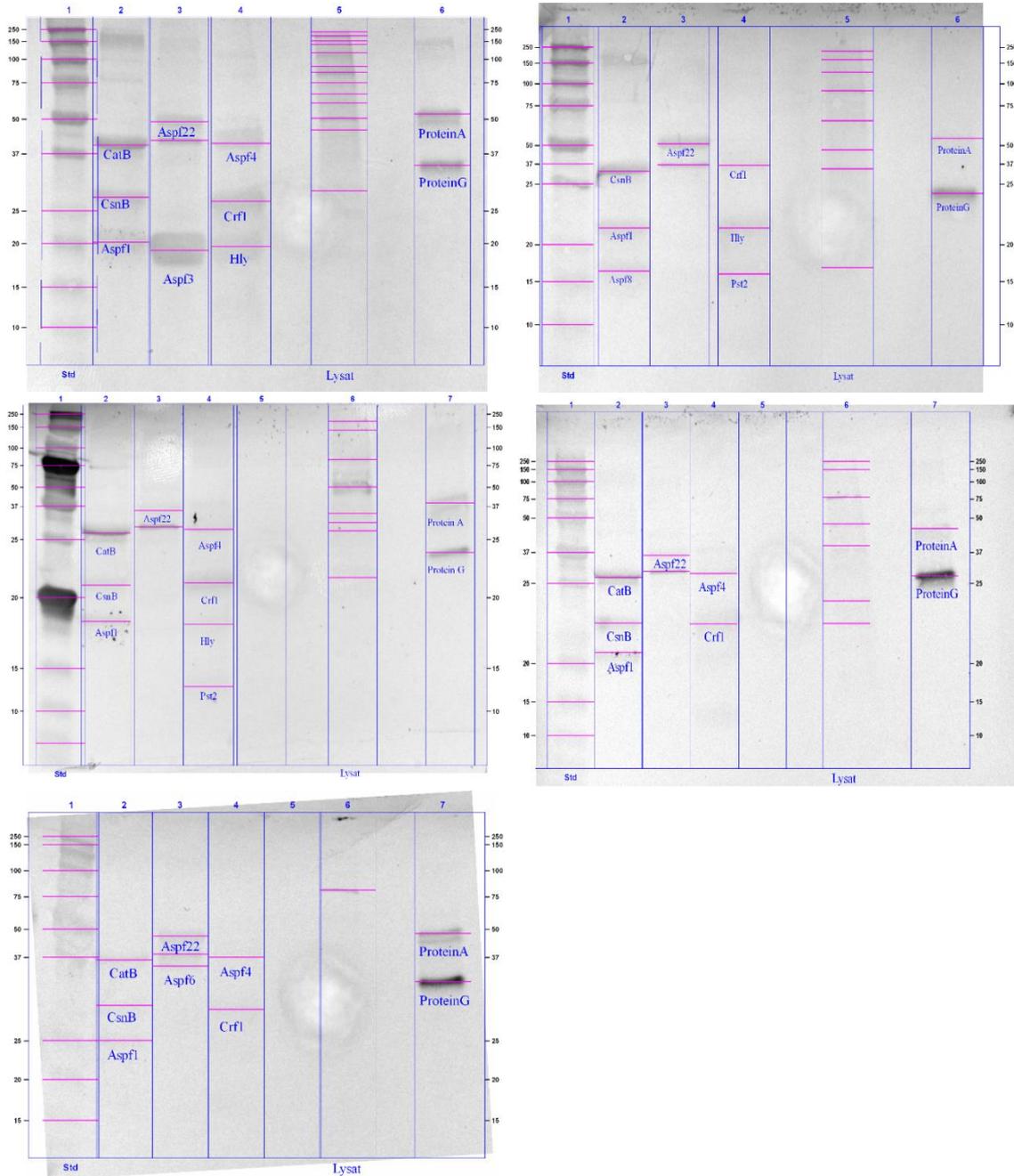
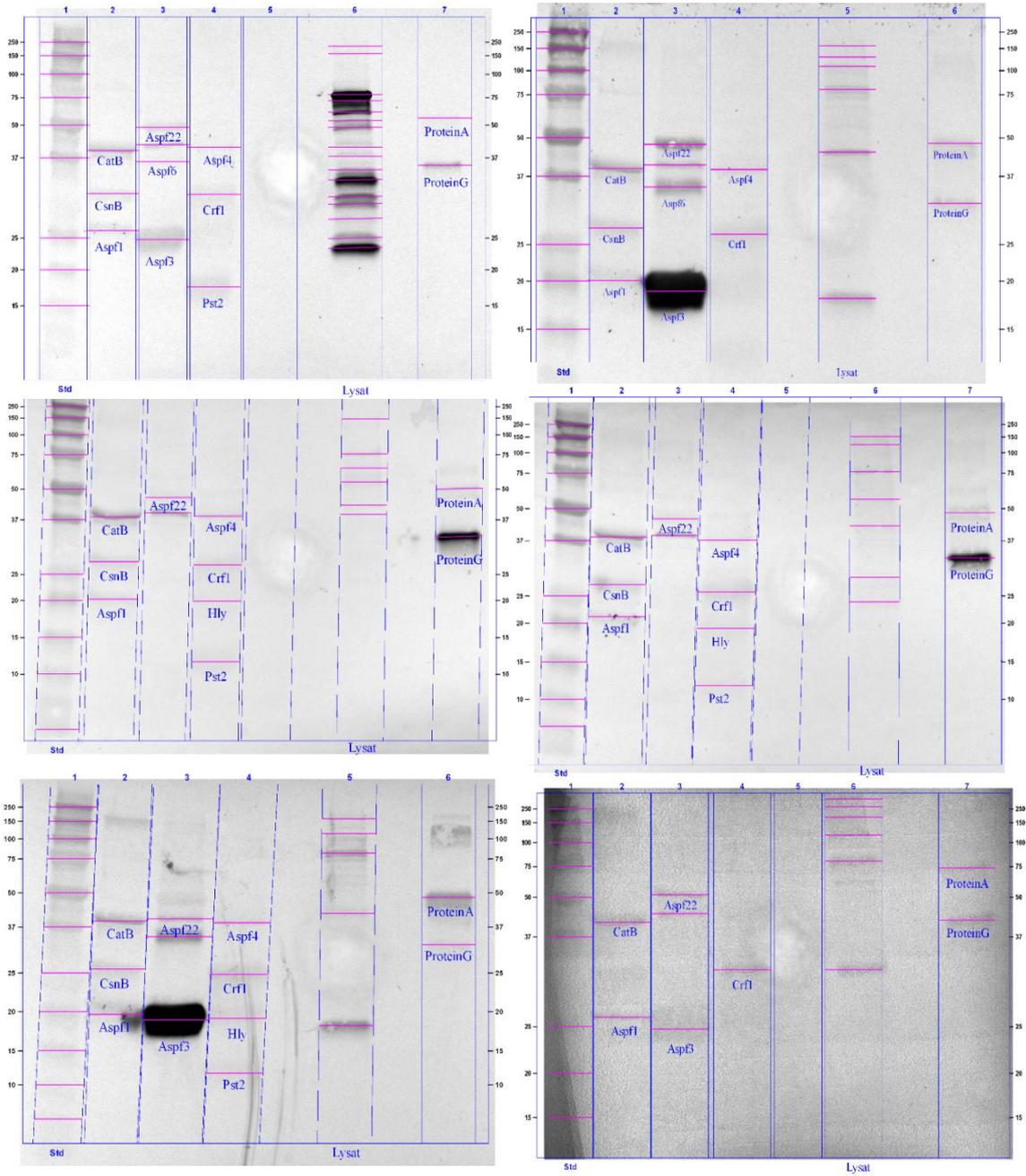


Abbildung 40: In Image-Lab 5.0 eingeleseene Western-Blots der 5 nicht-beruflich exponierten Kontrollen mit hoher Umweltexposition. Lane 1 mit standardisierten Molekulargewichtsmarkern, Lane 6 bzw. 7 mit Protein A und G zur Positivkontrolle. Es wurden 12 Antigene und das myzeliale Lysat getestet, wobei nur Banden bei vorhandenen IgE-AK gegen das getestete Antigen sichtbar werden. Manuelle Beschriftung der detektierten Banden. Anhand dieser Aufnahmen wurden die Bandenintensitäten ausgelesen.

A. fumigatus-IgE-Western Blots: Chronisch beruflich Exponierte



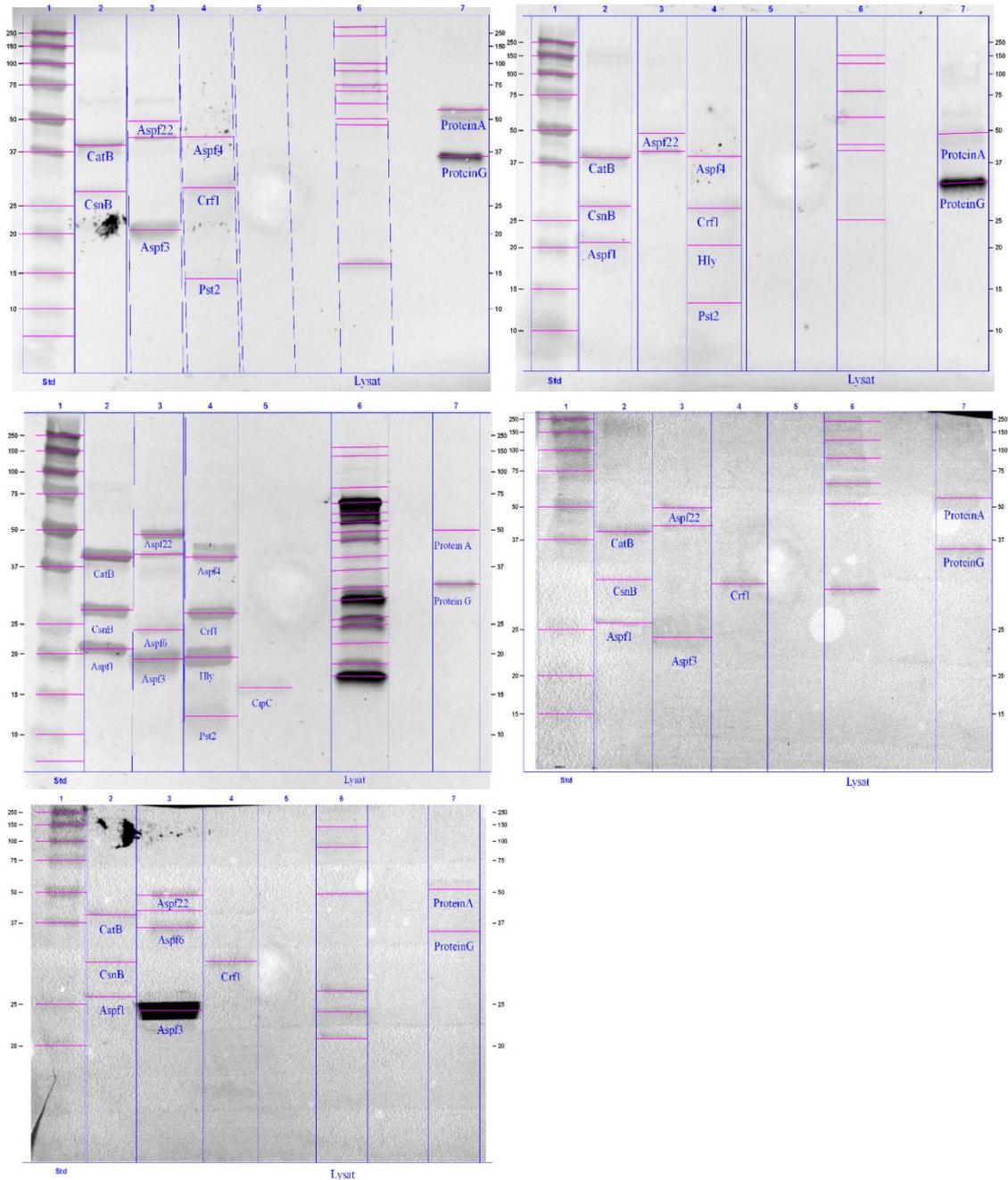


Abbildung 41: In Image-Lab 5.0 eingeleseene Western-Blots der 11 beruflich exponierten Probanden/-innen. Lane 1 mit standardisierten Molekulargewichtsmarkern, Lane 7 mit Protein A und G zur Positivkontrolle. Es wurden 12 Antigene und das myzeliale Lysat getestet, wobei nur Banden bei vorhandenen IgE-AK gegen das getestete Antigen sichtbar werden. Manuelle Beschriftung der detektierten Banden. Anhand dieser Aufnahmen wurden die Bandenintensitäten ausgelesen.

IV Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mir das Schreiben dieser Arbeit ermöglicht haben, insbesondere bei:

- Prof. Dr. med. Hermann Einsele für die Möglichkeit, an seiner Klinik wissenschaftlich tätig zu sein.
- Meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler, in dessen AG ich experimentell forschen durfte. Vielen Dank für die freundliche Unterstützung!
- Prof. Dr. med. Matthias Eyrich und Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf für die Mitgliedschaft im Betreuungskomitee der Promotion.
- Chris D. Lauruschkat, der mir als Betreuer stets mit Rat und Tat beiseite stand, mir das Arbeiten im Labor gelernt hat und sich auch immer wieder Blut abnehmen ließ. Vielen Dank für deine Bemühungen, Anregungen und wertvollen Tipps!
- Dr. Lukas Page und den weiteren Mitarbeitern/-innen der AG Löffler für die angenehme Zusammenarbeit.
- Der AG Brehm, bei denen ich meine Western Blots auslesen durfte.
- Allen Blutspendern/-innen und jenen, die mir geholfen haben, Biolandwirte/-innen für meine Studie zu akquirieren, darunter meine Freunde/-innen Judith, Flora, Adrian, und Miriam.
- Meiner Familie für alles.

V Lebenslauf

VI Eigene Veröffentlichungen

Lauruschkat C D, Etter S, Schnack E, Ebel F, Schäuble S, Page L, Rümens D, Dragan M, Schlegel N, Panagiotou G, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H, Wurster S, Loeffler J. Chronic Occupational Mold Exposure Drives Expansion of Aspergillus-Reactive Type 1 and Type 2 T-Helper Cell Responses. *Journal of Fungi*. 2021; 7(9):698. <https://doi.org/10.3390/jof7090698>

Lauruschkat C D, Page L, Etter S, Weis P, Gamon F, Kraus S, Einsele H, Wurster S & Loeffler J (2021). T-Cell immune surveillance in allogenic stem cell transplant recipients: Are whole blood-based assays ready to challenge ELISPOT? *Open Forum Infectious Diseases*, 8(1), [ofaa547]. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa547>

Lauruschkat C D, Page L, White P, Etter S, Davies H, Duckers J, Ebel F, Schnack E, Backx M, Dragan M, Schlegel N, Kniemeyer O, Brakhage A, Einsele H, Loeffler J, Wurster S (2021). Development of a Simple and Robust Whole Blood Assay with Dual Co-Stimulation to Quantify the Release of T-Cellular Signature Cytokines in Response to *Aspergillus fumigatus* Antigens. *Journal of Fungi*. 2021; 7 (6):462.

Lauruschkat C D, Page L, Etter S, Schnack E, Einsele H, Ebel F, Loeffler J, Wurster S (2020). Establishment of a whole blood ELISA to quantify T-cellular cytokine release in response to *Aspergillus fumigatus* antigens. *Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis*, Poster-Session Lugano 27.02.-29.02.2020