

Aus dem Institut für Immunologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Das Hausschwein als translationales Großtiermodell
zur Analyse der adaptiven antimykotischen Immunantwort
gegen aerogen übertragenen *Aspergillus fumigatus*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefanie Schmidt
Tierärztin aus Wolfen

Berlin 2021
Journal-Nr.: 4300

**Aus dem Institut für Immunologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Das Hausschwein als translationales Großtiermodell zur Analyse der adaptiven
antimykotischen Immunantwort gegen aerogen übertragenen *Aspergillus fumigatus***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Stefanie Schmidt

Tierärztin

aus Wolfen

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4300

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Susanne Hartmann
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Alber

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, animal models, aspergillus fumigatus, immune response, blood, lungs, lymph nodes, spleen, aerosols, real time PCR

Tag der Promotion: 02.12.2021

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-167-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2022 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungen	V
Tabellen	VII
Abkürzungen	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Literatur	3
2.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	3
2.1.1. Taxonomie.....	3
2.1.2. Vorkommen, Prävalenz und Bedeutung.....	3
2.1.3. Entwicklungszyklus und Morphologie.....	3
2.1.4. <i>Aspergillus fumigatus</i> als Krankheitserreger	6
2.1.4.1. Bedeutung in der Humanmedizin	6
2.1.4.2. Bedeutung in der Veterinärmedizin	8
2.1.5. Die physiologische Immunabwehr des Wirtes.....	12
2.1.5.1. Angeborene Immunabwehr	12
2.1.5.2. Erworbene Immunabwehr	15
2.1.6. Diagnostik invasiver Aspergillosen	18
2.1.7. Therapeutische Optionen bei <i>Aspergillus</i> -assoziierten Erkrankungen.....	21
2.2. Tiermodelle zur Erforschung <i>A. fumigatus</i> -assoziiierter Erkrankungen	23
2.2.1. Bisher etablierte Tiermodelle.....	23
2.2.2. Das Hausschwein als translationales Tiermodell	25
2.2.2.1. Vergleichende Aspekte der Anatomie	25
2.2.2.2. Vergleichende Aspekte des Immunsystems.....	26
3. Material und Methoden.....	28
3.1. Material.....	28
3.1.1. Laborgeräte	28
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	29

3.1.3.	Pharmazeutika, Chemikalien und Reagenzien.....	30
3.1.4.	Kommerzielle Sets	31
3.1.5.	Stimulatoren und Inhibitoren	31
3.1.6.	Zytokine und Wachstumsfaktoren	32
3.1.7.	Medien, Lösungen und Puffer	32
3.1.8.	Monoklonale Antikörper, Zellfarbstoff und magnetische Mikrobeads	33
3.1.9.	Software	34
3.2.	Methoden	35
3.2.1.	Ethikerklärung	35
3.2.2.	Tiere, Probennahme und Sektion.....	35
3.2.3.	Experimenteller Ablauf der <i>A. fumigatus</i> -Aerosolisierung	36
3.2.4.	Isolierung porciner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut, Lungengewebe, Lungenlymphknoten und Milzgewebe	38
3.2.5.	Restimulation der mononukleären Zellen mit <i>A. fumigatus</i> -Lysat	38
3.2.6.	Antigen-reaktive Anreicherung von porcinen CD154 ⁺ T-Helferzellen.....	39
3.2.7.	Expansion und autologe Restimulation von <i>A. fumigatus</i> -reaktiven Th-Zellen	39
3.2.8.	Durchflusszytometrie	40
3.2.9.	Rekultivierung der bronchoalveolären Spülflüssigkeit.....	40
3.2.10.	Histologische Untersuchung des Lungengewebes.....	40
3.2.11.	Pilz-DNA-Extraktion aus bronchoalveolärer Lavage und Serum.....	41
3.2.12.	<i>Aspergillus</i> -spezifische Real-time-PCR.....	41
3.2.13.	Leukozytenzählung und Differentialblutbild	42
4.	Ergebnisse	43
4.1.	Detektion und Charakterisierung <i>A. fumigatus</i> -reaktiver Th-Zellen in Blut und Lungengewebe konventionell gehaltener Schweine	43
4.2.	Analyse der <i>A. fumigatus</i> -spezifischen sowie gesamten T-Helferzellantwort nach experimenteller Konidienexposition.....	47
4.2.1.	Aerolisierung von <i>A. fumigatus</i> Konidien mittels Ultraschallvernebler in einer Aerosolkammer	47

4.2.1.1.	Evaluierung und Validierung der angestrebten Konzentration an <i>A. fumigatus</i> -Konidien in der Aerosolkammer	47
4.2.1.2.	Überwachung der Konidienkonzentration in der Aerosolkammer während der experimentellen Exposition der Schweine.....	48
4.2.1.3.	Nachweis der <i>A. fumigatus</i> -Konidien in der porzinen Lunge nach experimenteller Exposition.....	49
4.2.2.	Studiendesign der experimentellen <i>Aspergillus</i> -Exposition gesunder Schweine aus konventioneller Tierhaltung	51
4.2.3.	Ergebnisse der <i>A. fumigatus</i> -spezifischen Diagnostik.....	51
4.2.4.	Detektion <i>A. fumigatus</i> -spezifischer T-Zellen in Blut, Lungengewebe und Lungenlymphknoten nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition	53
4.2.5.	Magnetische Anreicherung und Charakterisierung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer Th-Zellen in Blut, Lungengewebe und Lungenlymphknoten.....	57
4.2.6.	Antigen-unspezifische Analyse der T-Helferzellantwort nach experimenteller Exposition mit <i>Aspergillus</i> -Konidien	62
4.3.	Vergleichende Analyse der <i>A. fumigatus</i> -spezifischen sowie gesamten T-Helferzellantwort von immunkompromittierten und immunkompetenten Schweinen nach experimenteller Exposition	64
4.3.1.	Etablierung eines geeigneten Immunsuppressionsregimes	64
4.3.2.	Ergebnisse der <i>A. fumigatus</i> -spezifischen Diagnostik.....	67
4.3.3.	Anreicherung und Charakterisierung <i>A. fumigatus</i> -spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen aus Blut und Lungengewebe von immunkompromittierten und immunkompetenten Schweinen im Vergleich	68
4.3.4.	Antigen-unspezifische Analyse der T-Helferzell-Antwort nach experimenteller Exposition mit <i>Aspergillus</i> -Konidien von immunkompromittierten Schweinen	72
4.4.	Analyse der akuten <i>Aspergillus</i> -spezifische T-Zellantwort im porzinen Lungengewebe nach experimenteller Exposition.....	74
4.4.1.	Akute pulmonale <i>Aspergillus</i> -spezifische Th1-Antwort.....	74
4.4.2.	<i>Aspergillus</i> -spezifische Th17-Antwort nach experimenteller Exposition	77
5.	Diskussion	82
5.1.	<i>A. fumigatus</i> -spezifische Th1-Zellen in gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung	84

5.2.	Pulmonale Akkumulation porziner, pilzreaktiver Th-Zellen nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition	88
5.3.	Drastische Reduktion der pulmonalen <i>Aspergillus</i> -reaktiven Th-Zellantwort infolge einer temporären Immunsuppression.....	92
5.4.	<i>Aspergillus</i> -reaktive Th17-Antwort lokal im Lungengewebe experimentell exponierter Tiere	96
5.5.	T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung porziner Th1-Zellen nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition.....	99
5.6.	Potenzial des Schweines als translationales Tiermodell zur Erforschung <i>Aspergillus</i> -assoziierter Erkrankungen	100
6.	Zusammenfassung	106
7.	Summary	107
	Literaturverzeichnis	108
	Publikationsliste.....	XI
	Finanzierungsquellen	XII
	Interessenskonflikte.....	XII
	Danksagung	XIII
	Selbstständigkeitserklärung	XV

Abbildungen

Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Morphologie von <i>Aspergillus fumigatus</i>	4
Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Aerosolkammer für die <i>Aspergillus</i> -Exposition	37
Abb. 4.1 Altersabhängige Detektion <i>A. fumigatus</i> -reaktiver T-Helferzellen in gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung mittels Durchflusszytomtrie	43
Abb. 4.2 Gesunde Schweine aus konventioneller Tierhaltung besitzen sowohl naive als auch Th1-Zytokin-sezernierende <i>A. fumigatus</i> -reaktive CD4 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut	45
Abb. 4.3 <i>A. fumigatus</i> -reaktive CD4 ⁺ T-Zellen können lokal im Lungengewebe von gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung nachgewiesen werden	46
Abb. 4.4 Immunhistologischer Nachweis von <i>A. fumigatus</i> -Konidien in der Lunge eines Schweines unmittelbar nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition.....	50
Abb. 4.5 Schema des Versuchsablaufes der experimentellen <i>Aspergillus</i> -Exposition gesunder Schweine aus konventioneller Tierhaltung in einer Aerosolkammer	51
Abb. 4.6 Mittels histologischer Untersuchung konnte kein Hyphenwachstum im Lungengewebe der <i>Aspergillus</i> -exponierten Schweine nachgewiesen werden	53
Abb. 4.7 Anstieg der Frequenz <i>A. fumigatus</i> -reaktiver CD4 ⁺ T-Zellen im Blut nach experimenteller Exposition gegenüber <i>Aspergillus</i> -Konidien	54
Abb. 4.8 Ex-vivo-Detektion der lokalen pilzspezifischen Th-Zellantwort deutet auf eine ausgeprägte <i>A. fumigatus</i> -spezifische Reaktivität in der Lunge hin	56
Abb. 4.9 Antigen-reaktive Anreicherung von porzinen CD4 ⁺ T-Zellen	58
Abb. 4.10 Die magnetische Anreicherung bestätigt den Anstieg pilzspezifischer T-Helferzellen im Blut gesunder Schweine nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition	59
Abb. 4.11 <i>A. fumigatus</i> -spezifische T-Zellen peripher im Blut sowie lokal im Lungengewebe weisen einen kohärenten Phänotyp auf.....	60
Abb. 4.12 Anreicherung pilzspezifischer T-Helferzellen nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition im Lungengewebe der Schweine	61
Abb. 4.13 CD154-unabhängige Analyse der Th-Zellreaktion nach <i>Aspergillus</i> -Exposition.....	63
Abb. 4.14 Reduzierung der Anzahl der Leukozyten im Blut von Schweinen in Folge verschiedener Zeitregime der immunsuppressiven Medikation.....	65

Abb. 4.15 Schema des Versuchsablaufes der experimentellen <i>Aspergillus</i> -Exposition immunkomprimierter Schweine in einer Aerosolkammer	66
Abb. 4.16 Immunsuppression von Schweinen in Folge der 6-tägigen Behandlung mit Cyclophosphamid und Methylprednisolon	66
Abb. 4.17 Die histologische Untersuchung ergab kein Hyphenwachstum im Lungengewebe der <i>Aspergillus</i> -exponierten, immunkompromittierten Schweine	68
Abb. 4.18 Vergleichbare Kinetik der akuten pilzspezifischen Immunantwort im Blut der immungeschwächten und immunkompetenten Schweine nach <i>Aspergillus</i> -Exposition	69
Abb. 4.19 Temporär immunsupprimierte Schweine zeigen lokal im Lungengewebe eine verminderte pilzspezifische T-Zellantwort nach <i>Aspergillus</i> -Exposition	70
Abb. 4.20 Schweine mit geringer Zahl <i>A. fumigatus</i> -reaktiver T-Helferzellen im Lungengewebe nach <i>Aspergillus</i> -Exposition zeigen verzögerte Pilzclearance	72
Abb. 4.21 CD154-unabhängige Analyse der T-Helferzellantwort nach <i>Aspergillus</i> -Exposition der temporär immunsupprimierten Schweine	73
Abb. 4.22 Versuchsschema zur Analyse der akuten pilzspezifischen T-Zellantwort lokal im Lungengewebe nach experimenteller Exposition	74
Abb. 4.23 Mittels immunhistologischer Untersuchung konnte kein Hyphenwachstum im Lungengewebe der <i>Aspergillus</i> -exponierten Schweine dargestellt werden	75
Abb. 4.24 Vergleichende Analyse pilzspezifischer T-Helferzellen in Blut und Lunge gesunder Schweine 4 Tage nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition	76
Abb. 4.25 Vergleichende Analyse pilzspezifischer CD4 ⁺ T-Zellen der Lunge von natürlich sowie experimentell exponierten Schweinen 4 Tage nach <i>Aspergillus</i> -Exposition	77
Abb. 4.26 Ex-vivo-Analyse der pilzspezifischen Th17-Antwort in porzinem Blut, Lungenlymphknoten und Lungengewebe nach experimenteller <i>Aspergillus</i> -Exposition	78
Abb. 4.27 In vitro expandierte <i>Aspergillus</i> -spezifische T-Zellen der Lunge experimentell exponierter Tiere zeigen höhere IL-17A Sekretion als natürlich exponierte Schweine	79
Abb. 4.28 Expandierte <i>Aspergillus</i> -spezifische Th-Zellen der porzinen Lunge zeigen nach Restimulation mit <i>C. albicans</i> -Antigen eine prominente IL-17A-Produktion	81

Tabellen

Tab. 3.1 Liste der Laborgerät.....	28
Tab. 3.2 Liste der Verbrauchsmaterialien	30
Tab. 3.3 Liste der Pharmazeutika, Chemikalien und Reagenzien	31
Tab. 3.4 Liste der kommerziellen Sets	31
Tab. 3.5 Liste der Stimulatoren und Inhibitoren	31
Tab. 3.6 Liste der Zytokine und Wachstumsfaktoren	32
Tab. 3.7 Liste der kommerziellen Medien und Lösung.....	32
Tab. 3.8 Liste der hergestellten Medien, Lösungen und Puffer.....	33
Tab. 3.10 Liste der Schwein-spezifischen monoklonalen Antikörper	33
Tab. 3.11 Liste der kreuzreaktiven Mensch- oder Maus-spezifischen Antikörper	34
Tab. 3.12 Liste der Zellfarbstoffe.....	34
Tab. 3.13 Liste der magnetischen Mikrobeads	34
Tab. 3.14 Liste der angewandten Software.....	34
Tab. 4.1 Messung der Konzentration in der Luft befindlicher <i>A. fumigatus</i> -Konidien nach Einsatz von Konidiensuspensionen unterschiedlicher Konzentrationen	48
Tab. 4.2 Messung der Konzentration in der Luft befindlicher <i>A. fumigatus</i> -Kondien während der experimentellen Exposition der Schweine.....	49
Tab. 4.3 Die Ergebnisse der <i>A. fumigatus</i> -spezifischen PCR in Lungenspülproben und Serum ergaben kein invasives Pilzwachstum	52
Tab. 4.4 Mittels <i>A. fumigatus</i> -spezifischer PCR in BAL und Serum konnte ein invasives Pilzwachstum bei immunkompromittierten Tieren ausgeschlossen werden	67

Abkürzungen

<i>A. felis</i>	<i>Aspergillus felis</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Abk.	Abkürzung
ABPA	Allergische bronchopulmonale Aspergillose (engl. allergic bronchopulmonary aspergillosis)
AIDS	Erworbenes Immun-Schwäche-Syndrom (engl. acquired immune deficiency syndrome)
AMs	Alveolarmakrophagen
APCs	Antigenpräsentierende Zellen (engl. antigen-presenting cells)
ARTE	Antigen-spezifischen T-Zell-Anreicherung (engl. Antigen-reactive T cell enrichment)
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BAL	Bronchoalveolären Lavage
CAR	Chimärer Antigenrezeptor (engl. chimeric antigen receptor)
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Unterscheidungsgruppen (engl. cluster of differentiation)
CD40L	CD40-Ligand (engl. CD40 ligand)
CF	Mukoviszidose (engl. cystic fibrosis)
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CFTR	engl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. chronic obstructive pulmonary disease)
CPA	Chronische pulmonale Aspergillose (engl. chronic pulmonal aspergillosis)
CPM	Cyclophosphamid
CT	Computertomographie
d-AMB	Amphotericin B-Desoxycholat
DCs	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix (engl. extracellular matrix)
ECs	Epithelzellen (engl. epithelial cells)
ELISA	Enzymimmunoassay (engl. enzyme linked immunosorbent assay)
ELISpot	Enzyme-linked-immuno-Spot

engl.	englisch
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (engl. granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GMP	Gute Herstellungspraxis (engl. good manufacturing practice)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HSCT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation (engl. hematopoietic stem cell transplantation)
i.m.	intramuskulär
IA	Invasive Aspergillose
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNKT	Invariante NK-T-Zelle
IPA	Invasive pulmonale Aspergillose
KbE	Koloniebildende Einheit
KIR	engl. killer cell immunoglobulin-like receptors
L-AmB	Liposomales Amphotericin B
LAP	LC3-assoziierten Phagozytose
lat.	lateinisch
LCMV	<i>Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus</i>
LFD	Lateral-Flow-Technologie (engl. lateral-flow device)
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	Monoklonaler Antikörper (engl. monoclonal antibody)
MACS	Magnetische Zellseparation (engl. magnetic activated cell sorting)
MAIT cells	Schleimhaut-assoziierte invariante T-Zellen (engl. mucosa-associated invariant T cells)
MAPK	MAP-Kinase (MAP engl. mitogen-activated protein)
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl. macrophage colony stimulating factor)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
Mo-DCs	von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen (engl. monocyte-derived dendritic cells)
MPS	Methylprednisolon
MRT	Magnetresonanztomographie

MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NET	Neutrophile extrazelluläre Fallen (engl. neutrophil extracellular traps)
NFAT	engl. nuclear factor of activated T-cells
NK	Natürliche Killerzelle
NM	nich gemessen (engl. not measured)
NO	Stickstoffmonoxid
p.o.	peroral (lat. per os)
PAS-Reaktion	Periodsäure-Schiff-Reaktion (engl. periodic acid schiff reaction)
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pDCs	Plasmazytoide dendritische Zellen (engl. plasmacytoid dendritic cells)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMNs	polymorphkernigen Zellen (engl. polymorphonuclear leukocytes)
PPRs	Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptors)
PTX3	Pentraxin 3
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
RT	Raumtemperatur
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAFS	engl. severe asthma with fungal sensitization
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
SEB	<i>Staphylococcus</i> Entrotoxin B
SNA	Sinonasale Aspergillose (engl. sino-nasal aspergillosis)
SOA	Sinoorbitale Aspergillose (sino-orbital aspergillosis)
sog.	sogenannt
sp.	Spezies (lat. species)
spp.	Spezies (lat. species pluralis)
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor)
Tfh	engl. T follicular helper cell
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Luftgetragene Sporen (Konidien) des Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) sind ubiquitär in der Umgebung vorhanden. Obwohl sowohl Menschen als auch Tiere täglich zahlreiche *Aspergillus*-Konidien einatmen, wird der Pilz in der Lunge gesunder Individuen meist beseitigt bevor es zu einem Krankheitsgeschehen kommt (Latge 1999). Jedoch insbesondere bei immungeschwächten Menschen sowie Patienten mit pulmonalen Vorerkrankungen stellt *A. fumigatus* einen bedeutenden Infektionserreger dar, welcher in Folge aerogener Übertragung schwere invasive Infektionen oder auch Überempfindlichkeitsreaktionen wie etwa allergische bronchopulmonale Aspergillose (allergic bronchopulmonary aspergillosis, ABPA) bei Patienten mit atopischem Asthma oder Mukoviszidose (cystic fibrosis, CF) verursachen kann (Latge und Chamilos 2020). Die rechtzeitige Diagnose invasiver Pilzinfektionen ist nach wie vor schwierig, da spezifische und hochempfindliche nicht-invasive Methoden für *A. fumigatus* fehlen. Im Falle einer invasiven Infektion werden jedoch Sterblichkeitsraten von über 50 % beschrieben (Karthaus und Buchheidt 2013). Daher ist die frühzeitige Einleitung einer gezielten antimykotischen Therapie der Schlüssel zur Verbesserung der Prognose der betroffenen Patienten (Cornely et al. 2011). Die Betrachtung der T-Helferzellantwort (CD4⁺) gegen spezifische Pilzpathogene kann dabei wichtige Informationen über den Wirt-Pathogen-Status liefern und diagnostisch für die Kategorisierung von Patientengruppen genutzt werden (Scheffold et al. 2018). Mit Hilfe der Antigen-spezifischen T-Zell-Anreicherung (ARTE) (Bacher und Scheffold 2013; Bacher et al. 2013) wurden *A. fumigatus*-spezifische CD154⁺ Th-Zellen im Blut des Menschen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass a) die stärkste T-Zell-Immunreaktivität gegen Pilzmembranproteine gerichtet ist (Bacher et al. 2014b); b) der Anteil der *A. fumigatus*-reaktiven konventionellen T-Zellen aller CD4⁺ T-Zellen bei gesunden Menschen zwischen 0,06 und 0,37 % liegt (Bacher et al. 2014a); c) die Mehrzahl der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helferzellen bei gesunden Menschen sich in einem naiven Zustand befindet und nur ein geringer Anteil IFN- γ produziert (Bacher et al. 2013; Bacher et al. 2014b); d) Patienten mit nachgewiesenen invasiven Infektionen deutlich erhöhte Frequenzen pilzreaktiver CD4⁺ T-Zellen im Blut zeigen (Bacher et al. 2015b; Steinbach et al. 2019) und e) *A. fumigatus*-spezifische T-Helferzellen (Th-Zelle) eine kleine Untergruppe von Th17-Zellen enthalten, welche kreuzreaktiv zu *Candida albicans* sind (Bacher et al. 2019). Aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit zu menschlichem Probenmaterial ist immer noch unklar, inwiefern die erhobenen T-Zell-daten im Blut mit denen lokal im mukosalen Lungengewebe vergleichbar sind (Jolink et al. 2017). Gegenwärtig etablierte Tiermodelle haben wesentlich zu unserem Verständnis der *Aspergillus*-Pathogenese sowie der Wirtsabwehr beigetragen (Desoubeaux und Cray 2018). Jedoch ist die intensive Betrachtung der lokalen sowie

zeitabhängigen *Aspergillus*-spezifischen T-Helferzellantwort in den meisten Tiermodellen limitiert aufgrund von Einschränkungen bezüglich der wiederholten Probennahme, geringer Organgrößen, des Fehlens eines natürlichen *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellpools, hoher Sterblichkeitsraten sowie der Nichtverfügbarkeit immunologischer Tools zur Detektion seltener, Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Aufgrund von Ähnlichkeiten der Anatomie der Atemwege und des Immunsystems (Meurens et al. 2012) sowie der natürlichen Exposition gegenüber Pilzaerosolen in der konventionellen Tierhaltung (Oppliger und Duquenne 2016) wurde das Hausschwein als translationales Großtiermodell ausgewählt, um die adaptive antimykotische Immunantwort gegen *A. fumigatus* zu untersuchen. Die Atemwege der Schweine sind in Bezug auf die Struktur des Tracheobronchialbaumes, die Lungenphysiologie und -größe (Judge et al. 2014) sowie die Anzahl der submukosalen Drüsen der Atemwege (Choi et al. 2000) eng mit denen des Menschen verwandt. Die Anatomie der Atemwege entscheidet letztlich auch über die Deposition von inhalierten Aerosolen in der Lunge (Phalen et al. 2008; Windt et al. 2010). Auch das Immunsystem von Schweinen wurden in den vergangenen Jahren genau charakterisiert und bietet eine breite Palette etablierter immunologischer Methoden und Instrumenten (Meurens et al. 2012; Saalmüller und Gerner 2016). Aufgrund der Ähnlichkeiten von Mensch und Schwein bezüglich der Zusammensetzung der Immunzellen im Blut, der Funktion der angeborenen Immunzellen, der funktionellen T-Zell-Untergruppen sowie der Zytokinsekretion stellt das Schwein ein relevantes Modell zur Untersuchung von humanen Infektionserkrankungen dar (Meurens et al. 2012). Für die Durchflusszytometrie existieren eine Vielzahl von schweinespezifischen sowie kreuzreaktiven Antikörpern zur Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Immunzellpopulationen (Dawson und Lunney 2018). Zudem wurde durch die Etablierung der Detektion von CD154 (CD40L) auf porcinen T-Zellen zur Identifizierung und Charakterisierung von Antigen-spezifischen T-Zellen die Untersuchung der adaptiven T-Helferzellantwort von Schweinen gegenüber eines definierten Pathogens ermöglicht (Ebner et al. 2017).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit stellt die Etablierung des Hausschweines als translationales Großtiermodell zur Erforschung der *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort gegenüber luftgetragenen Pilzsporen dar unter Bearbeitung folgender Schwerpunkte: a) Detektion und Charakterisierung des natürlich erworbenen, *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellpools bei gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung; b) Analyse der pilzspezifischen T-Helferzellantwort von gesunden sowie immungeschwächten Schweinen nach experimenteller *A. fumigatus*-Exposition unter Verwendung einer neuartigen Aerosolkammer und c) Gegenüberstellung *Aspergillus*-spezifischer T-Helferzellantworten im peripheren Blutkreislauf mit derer lokal in Lungengewebe sowie die Lunge drainierenden Lymphknoten.

2. Literatur

2.1. *Aspergillus fumigatus*

2.1.1. Taxonomie

Aspergillus fumigatus ist ein Schimmelpilz aus der Gattung der sog. Gießkannenschimmel (*Aspergillus*). Er gehört zu den Trichocomaceae, einer großen Familie innerhalb der Ordnung Eurotiales sowie der Klasse der Plectinomyceten des Stammes der Schlauchpilze (Ascomycota) (Geiser et al. 2006). *A. fumigatus* wurde erstmals 1863 vom deutschen Arzt und Botaniker J. B. Georg W. Fresenius beschrieben. Der Name „fumigatus“ ist vom lateinischen Wort „fumus“ (Rauch) abgeleitet. Dies bezieht sich auf die rauchgrüne Farbe der Konidien sowie auf deren rauchartige Verbreitung durch die Luft (Schmidt und Schmidt 1999).

2.1.2. Vorkommen, Prävalenz und Bedeutung

Aspergillus fumigatus ist ein sog. saprotropher Pilz, der sich vorwiegend von abgestorbenen Organismen ernährt. Er spielt somit eine wesentliche Rolle bei der Aufbereitung von Kohlenstoff und Stickstoff in der Umwelt. Sein primärer Lebensraum ist der Erdboden. Daher kommt er in großen Mengen in Garten- oder Gewächshauserde sowie als Hauptbewohner in Komposthaufen vor. *A. fumigatus* ist ein thermophiler Pilz, dessen Wachstum bei Temperaturen von bis zu 55°C und dessen Überleben sogar bei bis zu 70°C nachgewiesen wurde (Latge 1999; Latge und Chamilos 2020). Aufgrund seiner thermophilen Eigenschaften sowie der Fähigkeit sowohl saure als auch alkalische Umgebungsbedingungen zu tolerieren, ist *A. fumigatus* global verbreitet. 100 bis 1000 luftgetragene Sporen (Konidien) werden täglich von Menschen und Tieren eingeatmet. Obwohl *A. fumigatus* schwere Erkrankungen verursachen kann, kolonisiert er jedoch in der Regel nicht die Atemwege eines gesunden Menschen (Van De Veerdonk et al. 2017a).

2.1.3. Entwicklungszyklus und Morphologie

Das Wachstum der Zellen des *A. fumigatus* erfolgt in Form langgestreckter Fäden, den sog. Hyphen. Sie bilden das vegetative Myzel. Die effiziente Verbreitung erfolgt wiederum über asexuelle Sporulation. Dabei entstehen asexuelle Sporen (Konidien) in Ketten an den Phialiden, welche aus Konidiophoren entstehen und von charakteristischen Konidienköpfen getragen werden (Abb. 2.1) (Latge und Chamilos 2020). *A. fumigatus*-Konidien sind grün pigmentierte, echinulierte Kugelstrukturen mit einem Durchmesser von 2 bis 3 µm (Latge 1999;

Van De Veerdonk et al. 2017a). Bisher wurde angenommen, dass *A. fumigatus* sich ausschließlich asexuell reproduziert. Mittels Genomanalysen konnte jedoch das Vorhandensein von 215 Genen gezeigt werden, die in die sexuelle Vermehrung involviert sind, darunter die kreuzungstypspezifischen Gene MAT1-1 und MAT1-2, sowie Gene für die Pheromonsynthese (Galagan et al. 2005; Paoletti et al. 2005). 2009 konnte von O'gorman et al. gezeigt werden, dass die Kreuzung der Stämme zweier Kreuzungstypen („mating types“) – AFB62 (MAT1-1; isoliert aus einem Patienten mit invasiver Aspergillose) und AFIR928 (MAT1-2; isoliert aus der Umwelt) – in der Formation einer Cleistothecia (vollständiger geschlossener Fruchtkörper), welcher multiple Ascosporen (geblich-weiße bis grünlich-weiße sexuelle Sporen) enthielt (O'gorman et al. 2009). Die Bedingungen für die sexuelle Replikation sind allerdings sehr spezifisch und nicht physiologisch: 30 °C auf Hafermehlagar für 3 bis 6 Monate bei schlechter Belüftung und Dunkelheit. Obwohl Ascosporen bisher in der Natur nicht beobachtet wurden, existieren Hypothesen bezüglich deren Beitrag zum Überleben des Pilzes unter ungünstigen Umgebungsbedingungen, wie etwa in Komposthaufen mit hohen Temperaturbereichen aufgrund des Prozesses der Fermentation. Die Rolle von Ascosporen im Lebenszyklus von *A. fumigatus* ist somit bisher unklar. Die Tatsache, dass Ascosporen erst nach einem thermischen Schock bei 65 °C auskeimen, schließt jedoch aus, dass sie Aspergillosen auslösen können (Van De Veerdonk et al. 2017a; Latge und Chamilos 2020).

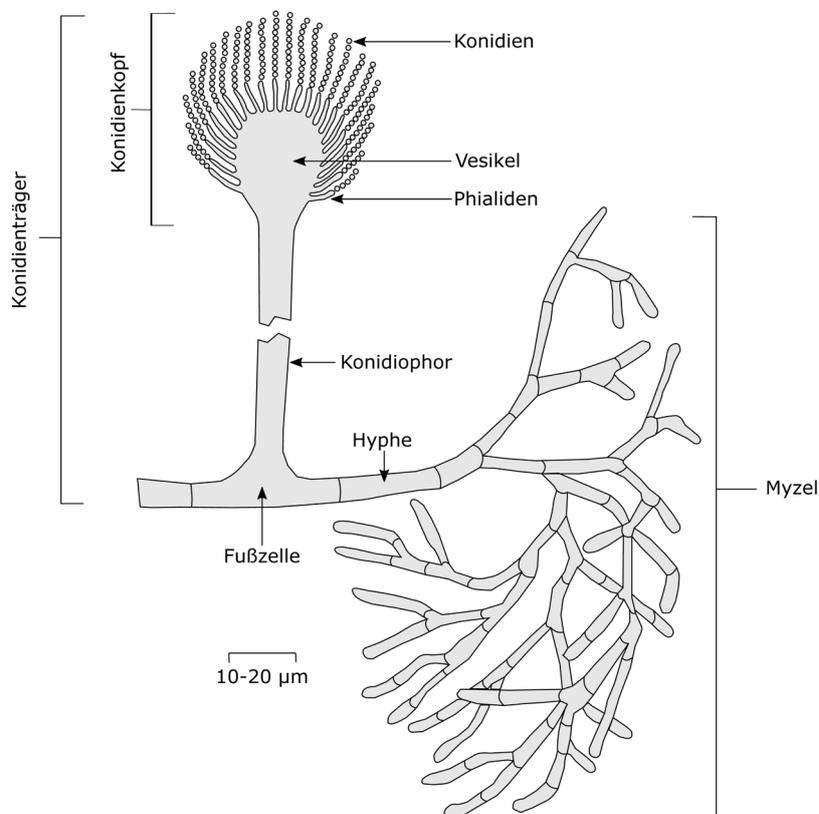


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Morphologie von *Aspergillus fumigatus*

Modifiziert nach (Schwienbacher 2005)

Infolge der Keimung bilden sich aus den Konidien wiederum kurze Hyphen, die sog. Keimschläuche. Das Hyphenwachstum beginnt und der Pilz formiert eine Kolonie aus septierten, mehrkernigen Zellen, welche in eine extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet sind. *A. fumigatus* weist eine der schnellsten Wachstumsraten aller Arten im Pilzreich auf, ein Attribut zahlreicher saprotropher Arten um multiple Nischen zu besiedeln (Van De Veerdonk et al. 2017a). Im Laufe des Lebenszyklus von *A. fumigatus* ändert sich die Zusammensetzung der Zellwand mit Voranschreiten des Zellzyklus sowie in Reaktion auf Umweltveränderungen kontinuierlich. Die innere Zellwand besteht aus einem alkali-unlöslichen fibrillären Gerüst aus verzweigtem β -1,3-Glucan an das Chitin, Galactomannan und β -1,3-Glucan/ β -1,4-Glucan kovalent gebunden sind. Dieser fibrilläre Kern der Zellwand ist eingebettet in einen amorphen, alkalilöslichen „Zement“, welcher hauptsächlich aus α -1,3-Glucan sowie den Galactosehaltigen Polysacchariden Galactomannan und Galactosaminogalactan besteht (Latge und Beauvais 2014). Die Konidien, welche den Wirt infizieren, unterscheiden sich in der Zellwandzusammensetzung deutlich vom vegetativen Myzel, sowohl bezüglich der Oberflächenmoleküle sowie der inneren Bestandteile. Die Konidienoberfläche ist von einem sog. „Rodlet-Layer“ umgeben, welcher aus hydrophoben Proteinen (Hydrophobinen) besteht. In der Zellwand der Konidien bilden α -1,3-Glucan (Beauvais et al. 2013), Melanin (Chai et al. 2010) und das RodA Hydrophobin (Carrion Sde et al. 2013) eine schützende Schicht um die Konidie. Die Hyphenzellwand unterscheidet sich wesentlich von der Zellwand der Konidien bezüglich der Verteilung der Kohlenhydrate. Im Zuge der Keimung wirft der Pilz seine äußere Melaninschicht sowie den „Rodlet-Layer“ ab und anschließend setzt sich das Hyphenwachstum fort. Dies führt aber nicht zum vollständigen Verlust von Melanin oder Hydrophobinen aus der Hyphenzellwand. In Abhängigkeit der Umweltbedingungen kann auch die Zellwand der Hyphen Melanin enthalten (Van De Veerdonk et al. 2017a). Ein Charakteristikum des vegetativen Wachstums von *A. fumigatus* ist die Formation einer Kolonie aus mehrzelligen sowie mehrschichtigen Hyphen, welche förmlich zusammenkleben. Aufgrund dieser Organisation wird diese Struktur oft als Biofilm bezeichnet, weil er typische Eigenschaften von Biofilmen, welche von Bakterien oder Hefen gebildet werden, besitzt (Beauvais und Latge 2015). Sowohl in vivo im Rahmen einer *Aspergillus*-Infektion als auch in der Umwelt auf solidem Substrat sind die Hyphen in diesen mehrschichtigen Pilzstrukturen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, bestehend aus Galactomannan, Galactosaminogalactan, α -1,3-Glucanen, Melanin und Hydrophobinen (Beauvais et al. 2007). Zudem kann sich die Zellwand von *A. fumigatus* infolge von externen, antimykotische Stimuli modifizieren, um solchen Stressoren zu widerstehen. Dieser Anpassungsprozess bzw. die Fähigkeit von *Aspergillus* spp. ihre Morphologie zu ändern, muss bei der Betrachtung der komplexen Wechselwirkung zwischen Wirtabwehr und Pilz berücksichtigt werden (Van De Veerdonk et al. 2017a).

2.1.4. *Aspergillus fumigatus* als Krankheitserreger

Die Verbreitung der asexuellen Sporen von *A. fumigatus* in der Umwelt ist hocheffektiv verglichen mit anderen *Aspergillus* spp., da *A. fumigatus*-Konidien wesentlich hydrophober sind und sich leicht verteilen. Dies spiegelt sich in den Beobachtungen wider, dass *A. fumigatus* der dominante Pilzbestandteil nach Luftprobensammlungen ist, einschließlich der Luft in Krankenhäusern (Pini et al. 2008; Demuyser et al. 2019). Menschen und Tiere atmen jeden Tag 100-1000 Sporen ein, die aufgrund ihrer geringen Größe auch die Alveolen der Lunge erreichen. In der Regel beseitigen die Zilien des Atemwegsepithels sowie residente Alveolarmakrophagen die Konidien aus der Lunge. In Individuen, die aufgrund des Immunstatus bzw. Vorerkrankungen der Atemwege *A. fumigatus*-Konidien nicht vollständig aus der Lunge eliminieren, können die Sporen auskeimen und schwere Infektionen verursachen. Die physiologische Körpertemperatur des Menschen bietet optimale Wachstumsbedingungen. Innerhalb von 4 bis 6 Stunden können sich aus den Konidien kurze Hyphen bilden (Van De Veerdonk et al. 2017a).

2.1.4.1. Bedeutung in der Humanmedizin

Aspergillus spp. sind beim Menschen für ein großes Spektrum an Erkrankungen verantwortlich (Kosmidis und Denning 2015). Abhängig vom Immunstatus des Betroffenen können *Aspergillus*-assoziierte Erkrankungen in 3 Gruppen mit unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen, klinischen Manifestationen sowie überlappenden Merkmalen eingeteilt werden. Unterschieden werden a) Aspergillosen in immunkompetenten Patienten, b) Aspergillosen in atopischen Patienten und c) invasive pulmonale Aspergillose in immunkompromittierten Patienten (Park und Mehrad 2009; Latge und Chamilos 2020). Nachfolgend sollen diese 3 Gruppen an *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen beleuchtet werden.

In immunkompetenten Individuen kann *A. fumigatus* chronische, nicht invasive Infektionen verursachen, die von der Entstehung eines sog. Aspergilloms („Pilzball“) bis hin zu chronisch entzündlichen, fibrotischen Prozessen reichen. Das Aspergillom stellt die saprophytische Besiedlung einer Körperhöhle, wie etwa der Lunge, dar und besteht sowohl aus toten als auch lebenden Myzelbestandteilen, Entzündungszellen, Fibrin, Mukus sowie Bestandteilen von degeneriertem Blut und Epithel. Als häufigster prädisponierender Faktor kann eine Vorerkrankung mit Tuberkulose angesehen werden, wobei sich das Aspergillom in einer präformierten Kaverne ausbildet. Tatsächlich entwickeln 20 % der Patienten in Folge einer kavitären Tuberkulose innerhalb von 3 Jahren ein Aspergillom (Todea et al. 2014; Denning et al. 2016; Patterson et al. 2016). Eine milde, selbstlimitierende Hämoptyse (Bluthusten), die bei 50 bis 90 % der Patienten auftritt, ist die typische Manifestation des Aspergilloms. Gelegentlich

kann die Hämoptyse jedoch massiv oder sogar tödlich sein (Latge und Chamilos 2020). Weitere chronisch entzündlichen *Aspergillus*-Infektionen werden bei Patienten mit chronischen, kavitären Lungenerkrankungen beschrieben, welche durch einen indolenten klinischen Verlauf eines chronisch entzündlichen Krankheitsgeschehens über Monate bis Jahre charakterisiert ist (Denning et al. 2016; Patterson et al. 2016). Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch konstitutionelle Symptome, Serum IgG-positive Antikörper (Präzipitine) gegen *A. fumigatus*, erhöhte Akutphasenmarker einer Entzündung und einen Immunstatus, der von normaler bis milder Immunsuppression reicht (Alastruey-Izquierdo et al. 2018). Das gesamte Spektrum nicht-invasiver *Aspergillus*-Erkrankungen, einschließlich des Aspergilloms, wird derzeit als chronische pulmonale Aspergillose (CPA, chronic pulmonal aspergillosis) zusammengefasst (Denning et al. 2016; Patterson et al. 2016). Defekte in der mukoziliären Clearance verbunden mit struktureller Lungenerkrankung und deregulierten Entzündungsreaktionen scheinen ein kritischer Faktor bei der Pathogenese von CPA zu sein. Vorherige mykobakterielle Lungeninfektionen, Emphyse, sowie chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (COPD, chronic obstructive pulmonary disease) oder andere chronische strukturelle Lungenanomalien sind weitere dominante Prädispositionen (Takazono und Izumikawa 2018; Latge und Chamilos 2020).

Die schwerwiegendste Form der Aspergillose bei atopischen Patienten ist die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis) (Latge und Chamilos 2020), welche sich nach Sensibilisierung gegen *Aspergillus*-Antigene bei einer spezifischen Untergruppe atopischer Patienten entwickelt: Patienten mit Mukoviszidose (Price et al. 2015) oder Personen mit genetischer Veranlagung für ABPA (Agarwal et al. 2013a). Klinische Symptome stellen episodisches Keuchen, Unwohlsein, leichtes chronisches Fieber und Husten, Auswurf mit braunem Schleim und Pfropfen, Schmerzen in der Brust, wandernde Lungeninfiltrate sowie Eosinophilie im Sputum und Blut dar. Im Verlauf der Erkrankung werden Bronchiektasien zu einer dominanten Begleiterscheinung der Erkrankung, was wiederum zu chronischen Lungensekreten, gelegentlich Hämoptyse sowie charakteristischen radiologischen Anomalien führen kann (Latge und Chamilos 2020). Die ABPA beschreibt eine Hypersensitivität gegenüber Sporen des Pilzes *A. fumigatus* und ist häufig mit Asthma assoziiert. Davon abzugrenzen sind bis zu 65 % aller Patienten mit refraktärem Asthma, die eine erhöhte Sensibilität gegenüber Pilzsporen zeigen, jedoch ohne die ABPA-Kriterien zu erfüllen (SAFS, severe asthma with fungal sensitization) (Parulekar et al. 2015).

Aspergillus stellt eines der häufigsten Ursachen für infektiöse Komplikationen bei stark immungeschwächten Patienten dar mit einer Sterblichkeitsrate von bis zu 50 % bei Patienten mit akuter Leukämie sowie nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) (Latge und Chamilos 2020). Aktuelle epidemiologische Studien in mehreren europäischen Ländern bestätigen zudem die Dominanz der invasiven pulmonalen Aspergillose (IPA) gegenüber

anderen invasiven Pilzinfektionen bei Patienten mit Leukämie und HSCT (Azie et al. 2012; Montagna et al. 2014; Robin et al. 2019). Grundsätzlich werden 4 Typen invasiver Aspergillosen (IA) unterschieden: a) die akute oder chronische invasive pulmonale Aspergillose – die häufigste Form der invasiven Aspergillose; b) die Tracheobronchitis sowie obstruktive Bronchialerkrankung mit verschiedenen Graden der Invasion – vorwiegend bei AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) Patienten; c) die akute invasive Rhinosinusitis und d) Disseminierte IA mit Gehirn- (10-40 % der Patienten mit Knochenmarkstransplantation) oder anderer Organbeteiligung (wie etwa Haut, Nieren, Herz oder Augen) (Latge 1999). Die klinischen Symptome der verschiedenen Arten der IA hängen von der oben aufgeführten Organlokalisation sowie der zugrundeliegenden Erkrankung ab. IPA manifestiert sich derzeit überwiegend als ambulant erworbene Lungenentzündung bei nicht-neutropenischen HSCT-Empfängern erst spät nach der Transplantation (Alangaden et al. 2002) und ist assoziiert mit der Einnahme von Kortikosteroiden sowie anderer Immunsuppressiva zur Therapie der chronischen Graft-versus-Host Erkrankung, mit Stoffwechselstörungen, sekundären Hämochromatosen, gehobenem Alter, Cytomegalievirus-Koinfektionen sowie weiteren Komorbiditäten (Pappas et al. 2010; Herbrecht et al. 2012; Neofytos et al. 2018). Im Rahmen der Organtransplantation tragen Empfänger einer Lunge, von Lunge und Herz, Dünndarm oder Leber das höchste Risiko einer invasiven Aspergillose (Cornet et al. 2002; Pappas et al. 2010; Herbrecht et al. 2012; Neofytos et al. 2018). Zunehmend wurde IPA jedoch auch bei bisher risikoarmen Patienten beschrieben. Im Speziellen sind dabei folgende Patientengruppen zu nennen: a) Patienten mit hämatologische Malignomen lymphoiden Ursprungs, die niedermolekulare Kinaseinhibitoren (small-molecule kinase inhibitors, SMKIs) – abzielend auf die Bruton-Tyrosinkinase (BTK), die MAPK/Erk-Signalkaskade sowie den JAK-STAT-Signalweg – erhalten (Lionakis et al. 2017a; Bazaz und Denning 2018; Dioverti et al. 2018; Ghez et al. 2018); b) Patienten auf Intensivstationen, welche sich von einer Sepsis erholen (Benjamim et al. 2005; Taccone et al. 2015); c) Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, welche infolge einer CAR-T-Zell-Therapie (Chimeric Antigen Receptor, CAR) und damit einhergehender immunsuppressiver Behandlung mit hohen Dosen an Kortikosteroiden eine Hyperzytokinämie entwickelt haben (Hill et al. 2018; Park et al. 2018) und d) kritisch kranke Patienten auf der Intensivstation mit schwerer Influenza (Van De Veerdonk et al. 2017b; Schauwvlieghe et al. 2018) oder anderen Virusinfektionen (Chen et al. 2018; Bae et al. 2019).

2.1.4.2. Bedeutung in der Veterinärmedizin

Aspergillosen stellen relative seltene Erkrankungen bei Säugetieren dar, trotz der zunehmenden Anzahl von immungeschwächten Tieren in der Veterinärmedizin, die auf das

Feline Immundefizienz-Virus, Fortschritte bei Chemotherapeutika und Nierentransplantationen zurückzuführen sind. Ausnahmen stellen die sinonasale Aspergillose bei Hunden, die Luftsackmykose bei Pferden, der mykotisch bedingte Abort und Mastitiden bei Rindern sowie die mykotische Lungenentzündung und disseminierte Infektionen bei Walen dar, die durch *Aspergillus* spp. verursacht werden. Im Gegensatz zu Säugetieren sind Vögel jedoch besonders anfällig an einer Aspergillose zu erkranken (Tell 2005).

Die sinonasale Aspergillose (sino-nasal aspergillosis, SNA) betrifft besonders dolichocephale und mesozepale Hunde, wie etwa den Deutschen Schäferhund oder Rottweiler (Sharman und Mansfield 2012). Sie wird hauptsächlich durch *A. fumigatus* verursacht, obwohl gelegentlich auch andere Schimmelpilze isoliert werden (Elad und Segal 2018). Tiefere Gewebeschichten sind normalerweise nicht betroffen, wobei gelegentlich die Beteiligung der *Lamina cribrosa* des Siebbeines beobachtet wird (Sharman und Mansfield 2012). Erste klinische Symptome, welche auch über längere Zeiträume (Monate, Jahre) auftreten können, sind unspezifisch und umfassen solche, die generell Infektionen der oberen Atemwege charakterisieren: mukopurulenter bis hin zu hämorrhagischem Nasenausfluss, der mit einer Depigmentierung des Nasenspiegels einhergehen kann (Sharp et al. 1991). Auch Fremdkörper oder Tumore im Nasenrachenraum können eine ähnliche Symptomatik hervorrufen und müssen differentialdiagnostisch bedacht werden (Cohn 2014). Die sinoorbitale Aspergillose (sino-orbital aspergillosis, SOA) hingegen tritt hauptsächlich bei Katzen auf und kann als Komplikation einer SNA in Erscheinung treten. Eine brachycephale Schädelkonfiguration wird als prädisponierender Faktor beschrieben (Barrs et al. 2012). Während SNA hauptsächlich durch *A. fumigatus* verursacht wird, ist die Entwicklung der SOA mit einer kürzlich beschriebenen *Aspergillus* sp., *Aspergillus felis*, assoziiert (Barrs et al. 2013). *A. felis* wächst invasiver als *A. fumigatus* und kann eine Lyse der Augenhöhlenplatte verursachen und schließlich in die Augenhöhle übergehen, was zur Entwicklung eines Granuloms sowie eines Exophthalmus führen kann. Anschließend können weitere benachbarte Organe angegriffen werden (Hamilton et al. 2000; Barrs et al. 2013).

Bei Pferden verursachen *Aspergillus* spp. in erster Linie Infektionen der Luftsäcke (Diverticulum tubae auditivae, große, blasenförmige Erweiterung der Ohrtrumpete zwischen der Schädelbasis und dem Schlundkopf direkt unter der Ohrspeicheldrüse gelegen) sowie Pneumonien (Seyedmousavi et al. 2015). Die Aspergillose bei Pferden wird als seltene, aber lebensbedrohliche Infektion angesehen. In einigen europäischen Studien liegt die Prävalenz zwischen 0,5% und 17% (Guillot et al. 1997). Prädisponierende Faktoren sind eine bestehende Enteritis (Hattel et al. 1991), die längere Verabreichung von Antibiotika, ein immunsuppressiver Immunstatus des Patienten, immunschwächende Erkrankungen wie die Salmonellose (Lepage et al. 2004) und das Vorliegen von Endokrinopathien oder Neoplasien (Carrasco et al. 1996). Dementsprechend tritt eine Infektion normalerweise auf, wenn

immunschwächende Faktoren die Penetration und das Wachstum von *Aspergillus*-Pilzen begünstigen, wobei jedoch keine Rasse- oder Geschlechterprädispositionen beschrieben sind (Lepage et al. 2004). Direkt an der Luftsackwand liegen einige wichtige nervale Strukturen (Gehirnnerven V, VII, IX, X, XI und XII; Ganglion cervicale craniale des Sympathikus und die Retropharyngeallymphknoten) und Gefäße (Arteria carotis interna und externa) des Kopfes, die im Rahmen einer Luftsackmykose geschädigt werden können (Davis und Legendre 1994). Dies resultiert in einer möglicherweise fatalen Epistaxis oder auch einer Lähmung verschiedener Hirnnerven, die unter anderem zu Dysphagie führen kann (Freeman 2015). Zudem sind Pferde die am häufigsten betroffene Tierart der mykotischen Keratitis meist infolge eines Traumas, das die Eintrittspforte für infektiöse Erreger darstellt. Als prädisponierende Faktoren werden die seitliche sowie hervorstehende Lokalisation der Augen des Pferdes diskutiert (Sherman et al. 2017).

Aspergillus spp. – insbesondere *A. fumigatus* – verursachen weltweit bekanntermaßen mykotische Pneumonien, Gastroenteritiden, Mastitiden, Plazentitiden und Aborte bei Wiederkäuern, insbesondere Kühen (Puntenney et al. 2003). Dabei stellt *A. fumigatus* einen häufig vorkommenden Schimmelpilz in Heu und Silage dar (Cole et al. 1977). Gesunde Kühe mit einem intaktem Immunsystem sind resistent gegen derartige opportunistische Infektionen. Milchkühe in der frühen Laktation sind jedoch anfälliger, wobei hämorrhagische Enteritiden häufiger bei Kälbern auftreten (innerhalb von 2 bis 4 Wochen nach dem Abkalben) (Puntenney et al. 2003). Mykotisch bedingte Plazentitiden ausgelöst durch *Aspergillus* spp. stellen eine wichtige Ursache für Aborte bei Rindern dar, vornehmlich im dritten Trimester der Trächtigkeit (Knutson und Kirkbride 1992). Ein früher Abort ab dem dritten Trächtigkeitmonat ist jedoch auch möglich. Bei Rindern tritt eine Plazentitis sekundär nach Dissemination des Erregers im gesamten Organismus auf. Dennoch treten vor dem eigentlichen Abort keine klinischen Anzeichen auf. Nach dem Abort kommt es jedoch hochfrequent zu einer Plazentaretention (Knutson und Kirkbride 1992). Studien konnten den Magen-Darm-Trakt als Eintrittspforte des Erregers identifizieren und die Infektion der ungeborenen Kälber auf einen Übertritt der Plazentaschranke zurückführen (Sarfati et al. 1996). Zudem hat die Inzidenz mykotischer Mastitiden bedingt durch *A. fumigatus*, zugenommen, wenn auch die Anzahl der gemeldeten Fälle geringer ist als bei kleinen Wiederkäuern (Las Heras et al. 2000).

Bei Meeressäugern werden Aspergillosen, obwohl sie als selten angesehen werden, mit zunehmender Häufigkeit dokumentiert (Barley et al. 2007; Dagleish et al. 2008; Abdo et al. 2012). *Aspergillus*-Erkrankungen sind unter den tödlichen Infektionskrankheiten bei Meeressäugern als Primärinfektion oder als Folge eines chronischen Infektionsprozesses von entscheidender Bedeutung und können auf eine zugrunde liegende Immunsuppression hinweisen (Abdo et al. 2012).

A. fumigatus gilt als einer der wichtigsten Krankheitserreger der Atemwege bei Vögeln (Beernaert et al. 2010; Arne et al. 2011). Sowohl Charakteristiken des Wirtes als auch des Pilzes erklären die besondere Anfälligkeit von Vögeln für eine *Aspergillus*-Infektion. Die Anatomie und Physiologie des aviären Lungen-Luftsack-Systems unterscheidet sich signifikant von der bronchoalveolären Lunge von Säugetieren. Neun Luftsäcke fungieren als Blasebälge, um Luft durch die Lunge für den Gasaustausch zu bewegen (Fedde 1998). *Aspergillus*-Konidien können mit einer Größe von 2-3 μm initiale physikalische Barrieren überwinden und tief in die Atemwege vordringen (Arne et al. 2011). Aviäre Luftsäcke sind besonders anfällig für Kontaminationen, da sie einem Luftstrom ausgesetzt sind, der die Partikelablagerung begünstigt. Zudem besitzen Vögel nur wenige residente Makrophagen in den Luftsäcken und einen gering ausgeprägten mukoziliären Transportmechanismus des Luftsackepithels, um Fremdpartikel zu entfernen (Maina 2006). Andere *Aspergillus* spp. wie *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus* konnten ebenfalls bei Aspergillosen bei kommerziellem Geflügel isoliert werden, dies jedoch viel seltener als *A. fumigatus* (Akan et al. 2002; Martin et al. 2007; Neumann 2016). In tropischen Ländern tritt *A. flavus* allerdings häufiger auf als *A. fumigatus* (Wang et al. 2012). Bemerkenswerterweise sind alle Vogelarten betroffen. Mit Ausnahme der Antarktis wurden bisher weltweit Aspergillose-Fälle bei Vögeln dokumentiert. Die klinische Manifestation von Aspergillose bei Vögeln hängt von der Infektionsdosis, der Sporenverteilung, vorbestehenden Erkrankungen sowie vom Immunstatus des Wirtes ab (Seyedmousavi et al. 2015). Es wird angenommen, dass eine beeinträchtigte Immunität und das Einatmen großer Mengen an Konidien wichtige ursächliche Faktoren sind (Hoerr 2010). Obwohl die aviäre Aspergillose vorwiegend eine Erkrankung der Atemwege ist, können alle Organe beteiligt sein, was zu einer Vielzahl an Manifestationen führt, die akut oder chronisch auftreten können (Seyedmousavi et al. 2015). Es wird angenommen, dass die akute Aspergillose durch das Einatmen einer überwältigenden Anzahl von Konidien verursacht wird. Schwere akute Infektionen treten im Allgemeinen bei jungen Vögeln auf und gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die akute Aspergillose kann eine Vielzahl unspezifischer klinischer Symptome hervorrufen: Anorexie, Lethargie, gekräuselte Federn, respiratorische Symptome, Polydipsie, Polyurie, Kümern, Dyskinesie sowie plötzlicher Tod (Seyedmousavi et al. 2015). Chronische Formen der Aspergillose bei Vögeln sind assoziiert mit kompromittiertem Immunstatus und treten sporadisch auf. Die chronische Ausprägung ruft eine geringere Mortalität hervor und tritt vornehmlich bei älteren Tieren in Erscheinung, welche aufgrund schlechter Haltungsbedingungen ein geschwächtes Immunsystem aufweisen (Vanderheyden 1993). Klinische Anzeichen der chronischen Form sind oft unspezifisch. Die betroffenen Tiere weisen eine verringerte Aktivität, Gewichtsabnahme und Belastungsintoleranz im Zusammenhang mit Atemnot auf. Die Beteiligung des Nervensystems verursacht Ataxie, Opisthotonos, Torticollis, Extremitätenparese und in einigen Fällen Blindheit

(Akan et al. 2002; Steinlage et al. 2003). Außerdem kann die Aspergillose bei Vögeln in Form einer Blepharitis, Keratitis und Keratokonjunktivitis, Infektionen der Haut, systemischen Erkrankungen, nasalen Infektion, mykotischen Spondylitis, Omphalitis oder artikulären Manifestation auftreten (Seyedmousavi et al. 2015). Zudem kann die Aufnahme von Futtermitteln, die durch toxische Metaboliten von *Aspergillus* spp. – wie etwa Gliotoxine Aflatoxine, Ochratoxine oder Sterigmatocystin – kontaminiert sind, bei Vögeln eine Mykotoxikose verursachen.

Bezüglich *Aspergillus*-Erkrankungen bei Schweinen existieren nur wenige Berichte von invasiven pulmonalen Manifestationen von *A. fumigatus* sowie mykotisch bedingten Aborten (Mason 1971; Nesbit 1986; Corona et al. 2004). Größere Bedeutung wird dem Einfluss toxischer Metabolite von *Aspergillus* spp. in Futtermitteln auf die Gesundheit konventionell gehaltener Schweine beigemessen (Guerre 2016; Pierron et al. 2016).

2.1.5. Die physiologische Immunabwehr des Wirtes

Normalerweise erfolgt die Beseitigung von inhalierten *Aspergillus*-Konidien täglich als Ergebnis einer vielschichtigen, hoch koordinierten Immunantwort, die die schnelle Eliminierung des Krankheitserregers bei gleichzeitiger Verhinderung entzündlicher Lungenschäden erwirkt. Die angeborene Immunität auf der Ebene der Epithelbarriere sowie der Phagozyten (hauptsächlich Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten) nimmt eine Schlüsselrolle bei der Clearance des Pilzes ein. Zudem spielen Wechselwirkungen zwischen Epithelien und Phagozyten sowie von Zelle zu Zelle innerhalb unterschiedlicher Phagozytentypen eine entscheidende Rolle bei der Feinabstimmung von Entzündungsreaktionen gegen *Aspergillus* sowie bei der Überwindung einer möglichen Infektion (Latge und Chamilos 2020)

2.1.5.1. Angeborene Immunabwehr

Die Epithelzellen der Lunge stellen die erste Verteidigungseinheit des Wirtes während der Interaktion mit *Aspergillus* dar (Osharov 2012). Aufgrund ihrer geringen Größe erreichen einige der inhalierten *Aspergillus*-Konidien die Alveolen der Lunge und interagieren schließlich mit alveolaren Epithelzellen (epithelial cells, ECs). Allerdings werden die meisten inhalierten Konidien bereits durch die mukoziliäre Clearance der Flimmerzellen des Oberflächenepithels aus der Lunge eliminiert (Kerr et al. 2016). Bisher wurden nur wenige Moleküle in der anfänglichen Wechselwirkung zwischen dem Pilz und Epithelzellen identifiziert: a) das Fucose-spezifische Lektin FleA, das mit Muzinen interagiert und die mukoziliäre Clearance begünstigt (Kerr et al. 2016); b) das Oberflächeninvasin CalA, das mit Integrin $\alpha 5\beta 1$ interagiert (Liu et al.

2017); c) das unspezifisch an das Epithel bindende Adhäsion Galactosaminogalactan (Beaussart et al. 2015) und d) ein Fibrinogen C-Domänen enthaltendes Protein 1 (FIBCD1), welches an Chitin bindet (Jepsen et al. 2018). Keimende Konidien auf der Epitheloberfläche lösen eine Reaktionskaskade aus, die durch die Freisetzung von antimikrobiellen Effektoren und Alarminen zur Auslösung einer Entzündungsreaktion sowie zur rechtzeitigen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist (Oshero 2012). Ebenso kommt es infolge des Kontaktes von *Aspergillus*-Hyphen mit Bronchialepithelien zur selektiven Aktivierung des p38/ERK1-2-Pfades und schließlich zur Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) (Balloy et al. 2008). Außerdem könnte das von ECs bei Pilzerkennung produzierte Interferon (IFN) Typ I und III die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten induzieren (Westphalen et al. 2014). Obwohl die Rolle der Epithelzellen der Lunge bei der Abwehr von *Aspergillus* noch nicht vollständig aufgeklärt ist, scheint das Epithel als Eintrittsportal von *A. fumigatus* eine wichtigere Position einzunehmen als bisher angenommen (Latge und Chamilos 2020).

Alveolarmakrophagen (AMs) im Lumen der Alveolen der Lunge sind die ersten Immunzellen, welche mit inhalierten *Aspergillus*-Konidien interagieren. Abgesehen von deren wesentlichen Funktion bei der Phagozytose inhalierten Konidien, sind diese AMs mit einzigartigen entzündungshemmenden Funktionen ausgestattet, welche wesentlich für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase sind (Romani 2011; Lionakis und Levitz 2018). Alveolarmakrophagen sind professionelle Phagozyten, charakterisiert durch die bemerkenswerte Fähigkeit, partikuläres Material – von ruhenden Konidien bis hin zu apoptotischen Zellen oder sogar Latexkügelchen – zu verschlingen (Yates und Russell 2005). AMs eliminieren phagozytierte *Aspergillus*-Konidien in angesäuerten Phagolysosomen effizient innerhalb von 24 h. Die Tötung der Konidien im Inneren AMs erfolgt über die NADPH-Oxidase-vermittelte Aktivierung der LC3-assoziierten Phagozytose (LAP). Während der Exposition gegenüber β -Glucanen und anderen immunstimulierenden Molekülen auf der Zellwandoberfläche von geschwollenen Konidien kommt es zur Aktivierung von Dectin-1 und andere Lektinrezeptorsignalen vom C-Typ. Dadurch kommt es zur Initiierung sowie Regulierung folgender weiterer Komponenten: der NADPH-Oxidase/ROS-abhängigen Aktivierung der LAP, des Inflammasoms, der Zytokin- und Chemokininduktion, der Regulation der TNF-Produktion sowie der Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten. Bestimmte Zytokine (z. B. IFN- γ) können die LAP sowie weitere Immunreaktionen der Alveolarmakrophagen modulieren (Latge und Chamilos 2020).

CCR2⁺ inflammatorische Monozyten sowie von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen (monocyte-derived dendritic cells, Mo-DCs) vermitteln den Transport von *Aspergillus* zu den drainierenden Lymphknoten und initiieren die adaptive Immunität (Hohl et al. 2009). Zudem nehmen inflammatorische Monozyten eine wesentliche Rolle innerhalb der angeborenen Immunabwehr ein (Espinosa et al. 2014). Inflammatorische Monozyten differenzieren schnell

zu Mo-DCs, was zu einer effizienten Aufnahme und Abtötung der Konidien in vivo führt. Darüber hinaus regulieren inflammatorische Monozyten die Konidien-abtötende Aktivität der neutrophilen Granulozyten. Dabei werden CCR2⁺ inflammatorische Monozyten für die Initiierung eines koordinierten Interferon-Signalwegs vom Typ I und Typ III benötigt, der entscheidend für eine optimale ROS (reactive oxygen species)-Produktion durch neutrophile Granulozyten ist (Espinosa et al. 2017; Seyedmousavi et al. 2018).

Zweifellos sind neutrophile Granulozyten die wichtigsten Immuneffektorzellen bei der Abwehr von *Aspergillus*. Insbesondere beim Menschen ist eine schwere Neutropenie der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose (Latge und Chamilos 2020). Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten tritt in zwei Wellen auf und wird reguliert durch a) epithelabhängige IL1R/MyD88-Signale und b) durch inflammatorische Monozyten vermittelte CARD9-Signalwege. Neutrophile Granulozyten verwenden hauptsächlich ROS-abhängige Tötungsmechanismen gegen intrazelluläre (Konidien) und extrazelluläre (Hyphen) Pilzmorphotypen. Die intrazelluläre Abtötung von Konidien wird durch Induktion des durch ROS induzierten Pilzzelltodes vom apoptotischen Typ vermittelt (Latge und Chamilos 2020). Die Typ I- und Typ III-Interferon-Signalübertragung durch CCR2⁺ inflammatorische Monozyten ist für eine optimale ROS-Produktion in Neutrophilen Granulozyten entscheidend (Espinosa et al. 2017). Die fungizide Wirkung von Neutrophilen Granulozyten wird durch eine autokrine Schleife der IL-17A-induzierten ROS-Produktion durch eine bestimmte Population von Neutrophilen nach Dectin-2-Aktivierung verstärkt (Taylor et al. 2014). ROS-unabhängige Mechanismen, die zur intrazellulären Hemmung führen, werden durch Zink- und Eisen-Mangel durch Lactoferrin und andere Effektoren vermittelt. ROS-induzierte NETose (Neutrophil Extracellular Traps, NET) ist ein weiterer Mechanismus der Hemmung von *Aspergillus*-Hyphen mit unklarer Rolle bei der Immunität in vivo (Latge und Chamilos 2020).

Über plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs), eine seltene Untergruppe dendritischer Zellen, die auf antivirale Immunität spezialisiert ist, wurde kürzlich berichtet, eine wesentliche Rolle bei der Immunität gegen *Aspergillus* zu spielen (Ramirez-Ortiz et al. 2011). pDCs würden selektiv *Aspergillus*-Hyphen angreifen, das Pilzwachstum hemmen und Zytokine (IFN- α und TNF) über einen TLR7/TLR9-unabhängigen Weg freisetzen, der durch Dectin-2 vermittelt wird (Loures et al. 2015).

Natürliche Killerzellen (NK) zeigen eine IFN- γ -vermittelte direkte Zytotoxizität gegen *Aspergillus*-Hyphen und spielen eine prominente Rolle in der antimykotischen Wirtsabwehr bei Neutropenie (Bouzani et al. 2011; Santiago et al. 2018). Invariante NKT-Zellen (iNKT) spielen ebenfalls eine nicht redundante Rolle bei der Kontrolle invasiver Aspergillosen infolge indirekter Aktivierung durch IL-12-produzierende Antigen-präsentierende Zellen nach Dectin-1-Aktivierung. (Bouzani et al. 2011)

Eosinophile tragen ebenfalls zur Immunität gegen *Aspergillus* durch direkte antimykotische abtötende Eigenschaften sowie die Regulation der entzündlichen Zytokinreaktionen von IL-23/IL-17 in der Lunge bei (Lilly et al. 2014; Guerra et al. 2017).

Abgesehen von umfangreichen Studien zur humoralen Abwehr gegen *Aspergillus*, die gezeigt haben, dass Anti-*Aspergillus*-Antikörper keine schützende Funktion bei der antimykotischen Abwehr einnehmen, wurde der Einfluss anderer zirkulierender humoraler Effektoren bisher unvollständig analysiert. Insbesondere Pentraxin 3 (PTX3), ein angeborener humoraler Effektor, spielt eine Schlüsselrolle bei der Verteidigung des Wirts gegen *Aspergillus*. PTX3, ein löslicher Rezeptor der Gruppe der Pattern-Recognition Receptors (PRRs), der von Epithelzellen und Phagozyten freigesetzt wird, wirkt als Opsonin und bindet selektiv an die Oberfläche von *Aspergillus*-Konidien. Dabei fördert PTX3 die Phagozytose über FcγRIIA (CD32) und CR-3-abhängige Mechanismen (Garlanda et al. 2002; Moalli et al. 2010).

2.1.5.2. Erworbene Immunabwehr

Studien zur akuten pulmonalen Aspergillose in Mausmodellen sowie in Patienten mit primärer Immundefekten bei vollständiger Abwesenheit aller Zellen lymphoiden Ursprungs ergaben, dass die adaptive Immunität eine redundante Rolle bei der Abwehr invasiver Aspergillosen spielt (Espinosa et al. 2014; Espinosa et al. 2017; Lionakis und Levitz 2018). Dennoch wurde sowohl CD4⁺ T-Helferzellen (Th1, Th2, Th17 sowie Th9) als auch cytotoxische CD8⁺ T-Zellen eine protektive oder auch krankheitsfördernde Bedeutung in der Wirtsabwehr gegen *A. fumigatus* zugeschrieben (Van De Veerdonk et al. 2017a). Bei Patienten nach erfolgter Stammzelltransplantation als auch in Studien an Mausmodellen spielten T-Helferzellen und cytotoxische T-Zellen tatsächlich eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der schützenden Immunität gegen *Aspergillus* (De Luca et al. 2012; Latge und Chamilos 2020). Auch die Existenz spezifisch gegen *A. fumigatus* gerichteter IFN-γ produzierender T-Zellen (Th1-Typ) bei an IPA erkrankten Patienten konnte gezeigt werden sowie deren Beitrag zur Protektion oder Abmilderung des Krankheitsverlauf (Hebart et al. 2002; Potenza et al. 2013). Bisher existieren jedoch nur wenige Studien in Tiermodellen sowie nur eine einzige klinische Studie im Menschen (Perruccio et al. 2005) zum protektiven Effekt des adoptiven Transfers *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen gegen IPA (Cenci et al. 2000; Bacher et al. 2015a; Papadopoulou et al. 2019). Ferner deuten zunehmend Anzeichen darauf hin, dass *Aspergillus*-spezifische CD4⁺ T-Zellen die antimykotische Immunantwort des Wirtes orchestrieren (Bacher et al. 2014b). Mit Hilfe der Antigen-spezifischen T-Zell-Anreicherung (ARTE) (Bacher und Scheffold 2013; Bacher et al. 2013) wurden konventionelle *A. fumigatus*-spezifische CD4⁺ T-Zellen anhand des Aktivierungsmarkers CD154 (CD40L) im Blut des Menschen untersucht. CD154 (CD40L), ein Mitglied der TNF-Superfamilie, wird infolge kurzfristiger (5-7 h) Ex-vivo-

Stimulation (Chattopadhyay et al. 2005; Chattopadhyay et al. 2006) hochreguliert und transient von konventionellen CD4⁺ T-Zellen nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation (TCR) exprimiert, jedoch sofort nach Bindung an CD40, das auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert wird, internalisiert (Lee et al. 2002; Koguchi et al. 2007). Die MHC-Restriktion von CD154 wurde zuvor durch Blockieren von menschlichem HLA-DR während der Antigenstimulation oder in TCR-transgenen Mäusen gezeigt (Kirchhoff et al. 2007; Bacher et al. 2016). Durch Einsatz eines CD40-blockierenden Antikörpers (Frentsch et al. 2005) während der 7-stündigen In-vitro-Stimulation der peripheren mononukleären Zellen des humanen Blutes mit *A. fumigatus*-Antigen gefolgt von einer magnetischen Anreicherung der *Aspergillus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen mittels MACS-Technologie (Bacher et al. 2013) konnte von Bacher et. al. gezeigt werden, dass a) die stärkste T-Zell-Immunreaktivität gegen Pilzmembranproteine gerichtet ist (Bacher et al. 2014b); b) die Häufigkeit von *A. fumigatus*-reaktiven konventionellen T-Zellen aller CD4⁺ T-Zellen bei gesunden Menschen zwischen 0,06 und 0,37 % liegt (Bacher et al. 2014a); c) 20-70 % der konventionellen *A. fumigatus*-spezifischen T-Helferzellen bei gesunden Menschen sich in einem naiven Zustand befindet und nur ein geringer Anteil IFN- γ produziert (Bacher et al. 2013; Bacher et al. 2014b); d) Patienten mit nachgewiesenen invasiven Infektionen deutlich erhöhte Frequenzen pilzreaktiver konventioneller CD4⁺ T-Zellen im Blut zeigen (Bacher et al. 2015b; Steinbach et al. 2019) und e) *A. fumigatus*-spezifische T-Helferzellen (Th-Zelle) eine kleine Untergruppe von Th17-Zellen enthalten, welche kreuzreaktiv zu *Candida albicans* sind (Bacher et al. 2019). Aufgrund der divergenten Expression der Aktivierungsmarker CD154 (CD40L) auf konventionellen sowie CD137 (4-1BB) auf regulatorischen T-Zellen nach 7-stündiger Antigen-Stimulation (Schoenbrunn et al. 2012) konnte zudem anhand der ARTE-Technologie gezeigt werden, dass die *A. fumigatus*-spezifische Gedächtnis-T-Zellantwort bei gesunden Menschen durch hochaffine, klonal expandierte CD137⁺ regulatorische T-Zellen dominiert wird (Bacher et al. 2014a).

Die Entwicklung CD4⁺ *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen ist bedingt durch das sog. Priming via Antigen-präsentierender Zellen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass CCR2⁺ inflammatorische Monozyten die adaptive T-Helferzellimmunität nach pulmonaler *Aspergillus*-Exposition aktivieren (Hohl et al. 2009). Dabei wird die Erzeugung der gegen *Aspergillus* gerichteten Th1- und Th17- Immunität mittels TLR/MyD88- bzw. Dectin-1-Signalwege reguliert. Zudem formieren Calcineurin-NFAT-Signalwege in CD103⁺ dendritischen Zellen die optimale Induktion von Th17-Reaktionen in der Lunge über die Produktion von IL-2 (Zelante et al. 2015). Insgesamt konnte jedoch bisher bezüglich der physiologischen Abwehr gegen *A. fumigatus* keine definitive Bedeutung der Th-17-Immunität gezeigt werden (Latge und Chamilos 2020). Dagegen wird die Th17-Immunität gegen *Aspergillus* zunehmend mit allergischen Lungenerkrankungen assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass *Aspergillus*-spezifische Th17-Zellen bei Patienten mit cystischer Fibrose (cystic fibrosis, CF), chronisch

obstruktiven Lungenerkrankungen (chronic obstructive pulmonary disease, COPD), Asthma sowie allergischen bronchopulmonale Aspergillosen (ABPA) expandieren und erhöhte Spiegel an IL-17 mit der Schwere der Erkrankung korrelieren. Bei Patienten mit ABPA ist die Anzahl der *Aspergillus*-spezifischen Th17-Zellen mit dem Krankheitsverlauf assoziiert und normalisiert sich während der Therapie. Th1- und Th2-Zellen blieben von dieser Entwicklung unberührt (Bacher et al. 2019). Zudem ist beschrieben, dass Th17-Zellen die Eosinophilie sowie Th2-Expansion und somit ein allergisches Entzündungsgeschehen in der Lunge fördern (Murdock et al. 2012). Dahingegen spielen *A. fumigatus*-spezifische regulatorische T-Zellen eine wesentliche Rolle bei der Immunhomöostase der Lunge. In Asthmapatienten konnte gezeigt werden, dass Defekte in der Expansion antimykotischer regulatorischer T-Zellen eine atypische Th2-vermittelten Immunpathologie zur Folge hatten (Bacher et al. 2016). Aufgrund der möglichen Hyperreaktivität von T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killerzellen sowie eosinophilen Granulozyten gegenüber IL-4 kommt es zur positiven Rückkopplungsschleife und Amplifikation der CD4⁺ Th2-Zellen, der Synthese von IL-4 und polyklonalen Aktivierung von IgE-produzierenden B-Zellen (Becker et al. 2015). Erst kürzlich wurde zudem die proinflammatorische sowie Allergie-fördernde Rolle der Th9-Zellen mittels IL-9-gesteuerter positiver Rückkopplungsschleife, die das allergische Entzündungsgeschehen verstärkt, beschrieben (Moretti et al. 2017). Neben FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen wurden auch *A. fumigatus*-spezifische Typ 1 regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) beschrieben, die die Expansion Antigen-spezifischen T-Zellen mittels IL-10-Sekretion regulieren und somit zur antimykotischen Immunhomöostase beitragen (Bedke et al. 2014). Jedoch trotz zahlreicher Publikationen zur T-Helferzellfunktion im Rahmen der antimykotischen Immunität, ist bisher noch unklar, welche Kombination an T-Helfer-Zellen die optimale Zusammensetzung für Wirtsabwehr gegen *A. fumigatus* darstellt (Van De Veerdonk et al. 2017a).

Bezüglich der cytotoxischen CD8⁺ T-Zellantwort wurde berichtet, dass TLR3 auf murinen sowie humanen DCs Pilz-RNA sortiert, um protektive MHC I-restriktive CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen gegenüber *A. fumigatus* zu aktivieren. Eine TLR3-Defizienz war mit schweren *Aspergillus*-Infektionen bei Mäusen verbunden und ein Einzelnukleotid-Polymorphismus von TLR3 war mit der erhöhten Anfälligkeit für Aspergillosen sowie der fehlenden Aktivierung von antimykotischen CD8⁺ T-Zellen bei HSCT-Patienten verbunden (Carvalho et al. 2012).

Neben cytotoxischen und T-Helferzellen wird zudem von CD4⁺/CD8⁻ Schleimhaut-assoziierten invarianten T-Zellen berichtet (mucosa-associated invariant T cells, MAIT cells), die nach nur 4-stündiger Stimulation mononukleärer Zellen des menschlichen peripheren Blutes mit *A. fumigatus*-Konidien auf T-Zell-Rezeptor-spezifische Weise durch Antigen-präsentierende Zellen stark aktiviert werden unter Hochregulation von CD69. Die genaue Rolle der „MAIT cells“ innerhalb der antimykotischen Abwehr ist jedoch bislang unklar (Jahreis et al. 2018).

2.1.6. Diagnostik invasiver Aspergillosen

Insbesondere invasive Infektionen mit *A. fumigatus* führen häufig zu Sterblichkeitsraten von über 50 % (Karthaus und Buchheidt 2013). Daher ist die rechtzeitige Diagnose und folglich sofortige Einleitung einer gezielten antimykotischen Therapie der Schlüssel zur Verbesserung der Prognose der betroffenen Patienten (Cornely et al. 2011). Bei der Diagnose der IPA werden entsprechend der Vorgaben der „European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group“ sowohl klinische, radiologische als auch mikrobiologische Kriterien herangezogen (De Pauw et al. 2008).

Klinische und radiologische Anzeichen zur Diagnose der IPA sind meist subtil und unspezifisch und manifestieren sich meist erst im späteren Krankheitsverlauf. Erste klinische Symptome können sein: leichtes Fieber; milder, unproduktiver Husten sowie Brustschmerzen. Starker produktiver Husten sowie Pleuraergüsse treten meist erst bei fortgeschrittener Erkrankung auf, weshalb bei Hochrisikopatienten mit respiratorischer antibiotika-resistenter Symptomatik das Vorliegen einer pulmonalen Aspergillose in Erwägung gezogen werden sollte (Latge und Chamilos 2020). Während Röntgenaufnahmen der Brust meist nicht sensitiv genug sind, um frühe Formen der IPA nachzuweisen (Kuhlman et al. 1985), werden jedoch hochauflösende CT (Computertomographie)- Scans der Brust empfohlen. Im Thorax-CT ergeben sich folgende Anzeichen: multiple Noduli (Knötchen), Halo-Zeichen (infolge sichelförmiger Einblutung um einen durch Thrombose hervorgerufenen Infarkt) sowie sichelförmige Lufteinschlüsse um den Aspergillenherd (Ullmann et al. 2018). Die charakteristischen Halo-Zeichen können jedoch auch nur vorübergehend auftreten oder gänzlich fehlen. Infolge einer Neutrophilen-vermittelten Entzündungsreaktion entwickeln sich die Herde zu sog. „Halbmond-Zeichen“ (mit Luft gefüllte Kavernen) (Greene et al. 2007). Jedoch besonders innerhalb der nicht-neutropenischen Patientengruppe kommt es häufig zu atypischen Erscheinungsbildern (Nucci et al. 2010). Sowohl die CT-Pulmonalisangiographie als auch ein neuartiges Bildgebungsverfahren, das die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit der Magnetresonanztomographie (MRT) kombiniert unter Einsatz radioaktiv markierter Antikörper („ImmunoPET/MR imaging“), stellen vielversprechende Diagnosetools gegenüber dem herkömmlichen CT dar (Rolle et al. 2016; Henzler et al. 2017).

Die mikrobiologische sowie histopathologische Kriterien bei der Diagnose invasiver Schimmelpilzinfektionen sind entscheidend für die Therapieeinleitung, erfordern jedoch oftmals invasive Eingriffe wie Bronchoskopien oder Gewebebiopsien. Trotz zahlreicher Testverfahren für einen direkten oder indirekten Nachweis von *A. fumigatus* aus klinischen Proben (Kultur, Antigen-Nachweis, PCR) ist die mikrobiologische Diagnose der IA nach wie

vor schwierig (Lamoth und Calandra 2017). *Aspergillus*-Kulturen aus Sputum, Bronchialsplüfung oder Bronchoalveolären Lavage (BAL) haben eine geringe Sensitivität von 30 % für die Diagnose invasiver Aspergillosen, jedoch einen hohen positiven Vorhersagewert (60 %) bei stark immungeschwächten Patienten (Ullmann et al. 2018). Aufgrund dessen wird eine Kombination verschiedener Testverfahren empfohlen (Lamoth und Calandra 2017). Für eine Pilzkultur werden Gewebeproben oder flüssige Materialien wie etwa die BAL entnommen. Das potenzielle Wachstum von *A. fumigatus* kann häufig bereits nach wenigen Tagen beurteilt werden. Für eine abschließende Bewertung ist jedoch die mehrtägige Inkubation notwendig (Mcclenny 2005). Neben der Anzüchtung des Pilzes sollte bei Patienten mit Verdacht auf IA zudem eine mikroskopische Untersuchung erfolgen (Ruhnke et al. 2018). Die morphologische Charakterisierung basierend auf makroskopischer Untersuchung und Mikroskopie wird nach wie vor für die Speziesidentifizierung filamentöser Pilze herangezogen. Weitere Untersuchungsmethoden – insbesondere molekulare Analysen zur Speziesidentifizierung – können angeschlossen werden (Lamoth und Calandra 2017). Mit dem Ziel frühere Diagnosen mit höherer Spezifität zu stellen, wurden zudem kulturunabhängige Testverfahren entwickelt (Patterson und Donnelly 2019). Die Anzahl der bisher in biologischen Flüssigkeiten von Patienten mit invasiver Aspergillose identifizierten zirkulierenden Biomarker ist im Wesentlichen auf zwei Arten von Molekülen begrenzt: Antigene auf Polysaccharidbasis der Zellwand (Galactomannan und (1,3)- β -D-Glucan) sowie Pilz-Desoxyribonukleinsäure (Pilz-DNA) (Latge und Chamilos 2020). Die Biomarker können in Serum, Urin, BAL, Cerebrospinalflüssigkeit oder sogar Sputum nachgewiesen werden (Lamoth und Calandra 2017; Xiao et al. 2018). Galactomannan stellt ein Polysaccharid der *Aspergillus*-Zellwand dar und wird mittels eines Enzymimmunoassays (ELISA) detektiert (Boch et al. 2016). Die Routineuntersuchung auf Galactomannan (zweimal wöchentlich oder häufiger) wird bei Hochrisikopatienten ohne Schimmelpilzprophylaxe empfohlen (Ruhnke et al. 2018). Auch (1,3)- β -D-Glucan stellt einen Hauptbestandteil der Zellwand von *A. fumigatus* dar, kommt darüber hinaus jedoch auch bei anderen Pilzen vor. Bei Patienten mit IA oder auch solchen mit hohem Risiko für die Ausprägung einer invasiven Mykose ist (1,3)- β -D-Glucan im Serum nachweisbar. Der Nachweis ist jedoch nicht *Aspergillus*-spezifisch und ist auch bei Erkrankungen mit anderen Pilzen wie etwa *Pneumocystis* oder *Candida* möglich (Patterson und Donnelly 2019). Auch der Nachweis von (1,3)- β -D-Glucan wird zum Screening von Patienten mit Prädisposition für invasive Mykosen angewandt (Ruhnke et al. 2018). Jedoch bei Patienten wie Organtransplantat-Empfängern oder bei nicht-neutropenischen Patienten ist die Sensitivität sowie Spezifität der Testergebnisse vermindert (Lamoth und Calandra 2017). Pilz-DNA stellt ein weiteres zirkulierendes Molekül dar, dass zur Diagnose der IA in Betracht gezogen wird. Zahlreiche sehr heterogene Protokolle für die PCR-Amplifikation wurden von verschiedenen Laboren veröffentlicht (Latge und Chamilos 2020). Die PCR-Analyse zielt

entweder auf 28S-RNA, die ITS1-5.8S-Region oder mitochondriale DNA ab (Powers-Fletcher und Hanson 2016). Jedoch aufgrund fehlender Standardisierung und Validierung wurden PCR-Verfahren bisher nicht in die EORTC/MSG-Guidelines aufgenommen (Patterson und Donnelly 2019). Insbesondere der Einsatz der PCR zum Nachweis von Pilz-DNA in Atemwegsmaterialien (BAL) sowie die Kombination mit Methoden zur Antigen-Detektion wird als effiziente Diagnostikstrategie beschrieben (Hoenigl et al. 2014; Ruhnke et al. 2018). Derzeitige Bestrebungen der „European *Aspergillus* PCR Initiative“ (EAPCRI) zielen auf die Standardisierung sowie klinische Evaluierung der *Aspergillus*-PCR-Diagnostikmethode ab, um eine Aufnahme in die EORTC/MSG-Guideline zu erreichen (Ruhnke et al. 2018; Patterson und Donnelly 2019). Auch weitere neu entwickelte diagnostische Methoden (z. B. Lateral-Flow-Technologie [LFD] oder Volatile-Metaboliten-Profile von *A. fumigatus* in der Atemluft) liefern bisher erste vielversprechende Ergebnisse (Ruhnke et al. 2018). Bisher liefert jedoch keine etablierte serologische Testmethode eine 100-prozentige zuverlässige Diagnose einer invasiven Aspergillose-Erkrankung (Latge und Chamilos 2020). Im Gegensatz zu immunkompetenten Patienten produzieren Individuen infolge einer zugrundeliegenden Immunsuppression keine *Aspergillus*-Antikörper. Das Vorhandensein großer Mengen von Anti-*Aspergillus*-IgG-Antikörpern spricht für das Vorliegen einer latenten, nichtinvasiven Form einer *Aspergillus*-Infektion wie einer latenten Kolonisation oder CPA, wohingegen erhöhte Level an Anti-*Aspergillus*-IgE-Antikörpern mit allergischen Aspergillosen assoziiert ist (ABPA oder SAFS) (Latge und Chamilos 2020).

Neueste Studien diskutieren den möglichen Einsatz Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen zur Diagnose pulmonaler Aspergillosen (Scheffold et al. 2018). Wie bereits erläutert, gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass T-Helferzellen an schützenden Immunantworten gegen Pilzinfektionen beteiligt sind. Das von Bacher et al. entwickelte Immunzell-basierte Verfahren, Antigen-reactive T cell enrichment (Bacher und Scheffold 2013; Bacher et al. 2013; Bacher et al. 2014a; Bacher et al. 2014b; Bacher und Scheffold 2015), ermöglicht die In-vivo-Analyse der kleinen Population an *Aspergillus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (meist < 0,1 % der gesamten T-Zellen im Blut) und erlaubt, den Wirt-Pathogen-Status exakt zu bestimmen sowie die Kategorisierung von Patientengruppen unter diagnostischen Gesichtspunkten (Bacher et al. 2015b). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass Patienten mit nachgewiesenen invasiven *Aspergillus*-Infektionen deutlich erhöhte Frequenzen pilzreaktiver CD154⁺CD4⁺ T-Zellen im Blut aufweisen (Steinbach et al. 2019). Derzeit sind T-Zell-basierte Methoden jedoch noch kein Bestandteil der klinischen Routinediagnostik.

2.1.7. Therapeutische Optionen bei *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen

Im Falle eines Aspergilloms besteht die Therapie der Wahl in der chirurgischen Resektion, die jedoch nicht selten aufgrund pulmonaler Dysfunktionen kontraindiziert und mit schweren Komplikationen assoziiert ist. Alternativ kann die intrakavitäre oder CT-gesteuerte perkutane Instillation von Amphotericin B-Desoxycholat (d-AMB) angewandt werden (Ullmann et al. 2018).

Wesentlicher Bestandteil der ABPA-Therapie ist die Verabreichung oraler bzw. zu inhalierender Kortikosteroide, um die inflammatorische Immunpathologie ausgelöst durch *A. fumigatus* zu unterdrücken. Auch die Anwendung einer Immuntherapie mit monoklonalem Anti-IgE Antikörper (Wirkstoff: Omalizumab) als Ersatz für Steroide liefert für ABPA bisher vielversprechende Ergebnisse (Voskamp et al. 2015). Zudem werden komplementär und in ausgewählten Fällen systemische Antimykotika eingesetzt (Ullmann et al. 2018).

Insbesondere die Behandlung der chronischen pulmonalen Aspergillose (CPA) stellt aufgrund des notwendigen längerfristigen Einsatzes von Antimykotika eine Herausforderung dar (Alastruey-Izquierdo et al. 2018). Meist erhalten Patienten mit CPA eine orale Medikation mit Itraconazol, wohingegen hartnäckige Fälle erfolgreich mit intravenösem d-AMB therapiert werden können (Agarwal et al. 2013b; Newton et al. 2016; Alastruey-Izquierdo et al. 2018). Aus nicht randomisierten Studien geht hervor, dass neben Itraconazol auch Voriconazol als Mittel der Wahl entsprechend veröffentlichter Behandlungsrichtlinien Anwendung in der CPA-Therapie findet (Alastruey-Izquierdo et al. 2018). Resistenzen gegenüber Azol-Mykotika, schwerwiegende Nebenwirkungen der Medikamente sowie die Schwierigkeit, das Ansprechen auf die Behandlung aus ärztlicher Sicht zu beurteilen, erschweren die optimale Therapie der CPA. Als alternative Behandlungsmethoden kommen die intravenöse Anwendung von Polyenen oder Echinocandinen, die Kombination von Azolen mit Echinocandinen sowie die Inhalation von AMB in Betracht (Latge und Chamilos 2020).

Im Rahmen der Therapie der invasiven Aspergillose hat sich durch Betrachtung der mittleren Überlebensraten von Patienten mit Aspergillose in randomisierten Studien Voriconazol als Mittel der Wahl herauskristalisiert (Herbrecht et al. 2002). Entsprechend neuerer Studien stellt auch Isavuconazol (Maertens et al. 2016) ein probates Mittel zur Therapie invasiver *Aspergillus*-Infektionen dar. Als alternative Behandlung ist Posaconazol beschrieben, ein neueres Triazol mit Breitbandaktivität gegen *Aspergillus* sowie andere Schimmelpilze (Ullmann et al. 2018). Des Weiteren ist der Einsatz von L-AmB sowie der Echinocandine Caspofungin und Micafungin insbesondere bei bekannten Resistenzen oder Intoleranzen beschrieben (Denning et al. 2016; Alastruey-Izquierdo et al. 2018; Ullmann et al. 2018). Um mehr Therapieerfolge zu erzielen und Sterblichkeitsraten zu reduzieren, werden stets neue Behandlungsstrategien untersucht. So wird etwa die Kombinationstherapie mit Antimykotika

unterschiedlicher Gruppen bei Infektionen mit vorhandenen Azolresistenzen empfohlen (Ullmann et al. 2018). Bei ausgewählten Patienten kann zudem die chirurgische Resektion von infiziertem Lungengewebe einem Therapieversagen, Rezidiven sowie tödlichen Blutungen vorbeugen (Reischies und Hoenigl 2014). Zahlreichen präklinische Studien der letzten Jahrzehnte adressieren zudem verschiedene Immuntherapeutika unter Einsatz von: a) Zytokinen, b) myeloischen hämopoetischen Wachstumsfaktoren (M-CSF), c) Phagozytentransfusionen, d) *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen, f) gegen β -Glucane gerichteten CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-Zellen, g) Checkpoint-Inhibitoren, h) NK-Zellen und i) Impfstoffen zur Steigerung der *Aspergillus*-spezifischen Immunabwehr (Latge und Chamilos 2020).

Aufgrund der beschriebenen Beteiligung der T-Zell-Immunität an der Abwehr von Pilzpathogenen sowie der dokumentierten Wirksamkeit des adoptiven Transfers von Antigen-spezifischen T-Zellen zur Prophylaxe und Behandlung von Virusinfektionen nach einer Transplantation wuchs das Interesse an der Entwicklung *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen als neuartige antimykotische Therapie für Empfänger von hämatopoetischen Stammzelltransplantaten (Papadopoulou et al. 2016). Jedoch im Gegensatz zu den bemerkenswerten Fortschritten bei virusspezifischen T-Zellen steht die klinische Entwicklung pilzspezifischer T-Zellen noch am Anfang. Bereits mehrere Gruppen haben *Aspergillus*-spezifische T-Zellen bei gesunden Personen und Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen charakterisiert (Hebart et al. 2002; Perruccio et al. 2005; Beck et al. 2006; Potenza et al. 2007; Beck et al. 2008; Bozza et al. 2009; Chaudhary et al. 2010; Bacher et al. 2013; Jolink et al. 2013; Potenza et al. 2013; Bacher et al. 2014b; Jolink et al. 2014; Perruccio et al. 2015). Dabei kamen verschiedene Methoden zur Identifikation *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen zum Einsatz: a) T-Zell-Proliferationsassay, b) Grenzwert-Verdünnung (Limiting Dilution), c) intrazelluläre Anfärbung von Zytokinen, d) ELISpot (Enzyme-linked-immuno-Spot), e) Selektion anhand der CD154-Expression, f) magnetische Anreicherungsverfahren (Antigen-reactive T cell enrichment, ARTE) sowie g) die Kombination mehrerer Methoden (Papadopoulou et al. 2016). Des Weiteren existieren zahlreiche Ansätze GMP (Good Manufacturing Practice) -konformer Methoden zur Ex-vivo-Expansion oder Bioverfahrenstechniken zur Erzeugung *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen für mögliche Immuntherapien (Ramadan et al. 2004; Perruccio et al. 2005; Beck et al. 2006; Zhu et al. 2008; Tramsen et al. 2009; Khanna et al. 2011; Gaundar et al. 2012; Kumaresan et al. 2014; Bacher et al. 2015a; Stuehler et al. 2015; Papadopoulou et al. 2019). In Tiermodellen konnte bereits die protektive Wirkung der Konstitution von *Aspergillus*-spezifischen T-Zellantworten nach allogener Stammzelltransplantation vor der Entwicklung einer invasiven Aspergillose gezeigt werden (Papadopoulou et al. 2016). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde allerdings nur eine klinische Studie zur adoptiven Immuntherapie bei der IA im Menschen durchgeführt und in der

Literatur beschrieben (Perruccio et al. 2005). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *Aspergillus*-Infektionen nach haploidentischer Stammzelltransplantation bei Patienten, die CD4⁺ *Aspergillus*-spezifische T-Zellklone erhielten, häufiger geheilt wurden als bei Patienten, die keinen T-Zelltransfer erhielten. Zudem konnten die pilzspezifischen T-Zellen in hohen Frequenzen drei Wochen nach der Infusion der spezifischen T-Zellklone im Blut der Testpersonen nachgewiesen werden (Perruccio et al. 2005). Insgesamt stellt die adoptive Immuntherapie mit *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der zukünftigen Behandlung invasiver Aspergillosen dar, bedarf allerdings weiterer klinischer Forschung.

2.2. Tiermodelle zur Erforschung *A. fumigatus*-assoziierter Erkrankungen

Um die Komplexität *A. fumigatus*-assoziierter Erkrankungen zu erfassen, scheint die Entwicklung von Tiermodellen ein wertvolleres Forschungsinstrument zu sein als In-vitro-Experimente. In der Theorie ahmen Tiermodelle den klinischen Verlauf und die Symptome der Erkrankung, wie sie bei menschlichen oder auch tierischen Patienten beobachtet wurden, so genau wie möglich nach. Es wird zudem angenommen, dass sie leichter umsetzbar sind und somit schneller zuverlässige wissenschaftliche Ergebnisse liefern als dies aufgrund eingeschränkter Zugänglichkeit anhand von Probenmaterialien von erkrankten Patienten oder mittels klinischer Studien möglich wäre (Desoubeaux und Cray 2017). Tierinfektionsmodelle haben bereits dazu beitragen, die pathophysiologischen Prozesse der Aspergillose zu verstehen sowie Virulenzfaktoren des Pilzpathogens, die Bewertung diagnostischer Instrumente sowie die therapeutische Wirkung von Antimykotika zu untersuchen (Desoubeaux und Cray 2018).

2.2.1. Bisher etablierte Tiermodelle

Verschiedene Säugetierarten wurden als translationale Tiermodelle in der *Aspergillus*-Forschung eingesetzt: insbesondere Mäuse (Lewis und Wiederhold 2005), aber auch Ratten (Gavalda et al. 2005; Desoubeaux und Chandenier 2012), Meerschweinchen (Vallor et al. 2008) und Kaninchen (Such et al. 2013). Zudem existieren wenige Studien an nicht-humanen Primaten (Cenci et al. 2000) sowie Kühen (Jensen et al. 1993). Mit einem Anteil von 85 % aller Publikationen werden Mausmodelle mit Abstand am häufigsten bei der Erforschung *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen eingesetzt (Clemons und Stevens 2005; Lewis und Wiederhold 2005). Neben positiver Faktoren muriner Modelle wie der leichten Zugänglichkeit, relativ kurzen Generationszeit und Verfügbarkeit genetisch definierter Stämme ergeben sich

insbesondere aufgrund der geringen Körpergröße dieser Spezies Limitationen für die Infektionsforschung. Bei Infektionsversuchen mit Mäusen können nur geringe Blutmengen entnommen werden. Darüber hinaus ist eine wiederholte Probenahme schwierig, insbesondere bei Tieren mit vermindertem Allgemeinzustand. Die geringe Lungengröße von Mäusen kann – insbesondere im Hinblick auf die Anwendung als translationales Tiermodell – zu einer abweichenden Kinetik im Infektionsverlauf, etwa bezüglich der Inhalation luftgetragener Konidien, im Vergleich zum Menschen beitragen. Bei gleicher Geschwindigkeit des Pilzwachstums wird die viel kleinere murine Lunge zudem viel schneller überwältigt als die menschliche Lunge, was möglicherweise Konsequenzen für die Wahrscheinlichkeit einer hämatogenen Verbreitung hat (Desoubeaux und Cray 2018). Außerdem gibt es zunehmend Hinweise auf wesentliche funktionelle Unterschiede zwischen dem menschlichen und dem murinen Immunsystem, was eine begrenzte Übertragbarkeit der Daten aus Studien mit murinen Zellen oder Tiermodellen zur Folge hätte (Mestas und Hughes 2004; Reynolds und Haniffa 2015; Hellmann et al. 2017). Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung des murinen Leukozytenrepertoires sich von der des Menschen unterscheidet. Bei Mäusen sind nur 7–28% der peripheren Blutleukozyten polymorphkernige Granulozyten, im Gegensatz zu 35–70% im menschlichen Blut (Relle et al. 2011). Unterschiede werden darüber hinaus bezüglich folgender Faktoren der angeborenen als auch erworbenen Immunität beschrieben: Toll-like Rezeptoren, induzierbare NO (Stickstoffmonoxid) -Synthase, inhibitorische Rezeptorfamilien Ly49 und KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) von Natürlichen Killerzellen, Fc-Rezeptoren, Immunglobulin-Untergruppen, Signalwegkomponenten der B-Zellen (BLNK, Btk und $\lambda 5$) und T-Zellen (ZAP70 und gemeinsame γ -Kette), Thy-1-Membran-Glykoprotein, $\gamma\delta$ -T-Zellen, Zytokine und Zytokinrezeptoren, Th1/Th2-Differenzierung, kostimulatorische Molekülexpression und -funktion, Antigen-präsentierende Funktion von Endothelzellen sowie Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression (Mestas und Hughes 2004). Anhand vergleichender Funktionsanalysen von menschlichen und murinen dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und polymorphkernigen Zellen (PMNs) konnte gezeigt werden, dass *A. fumigatus* keine identischen sondern relativ spezifische Reaktionen in murinen und menschlichen Immunzellen initiierte (Hellmann et al. 2017). Außerdem konnte mittels virtueller Infektionsmodellierung unter Berücksichtigung der jeweiligen Lungenphysiologie und des Einflusses eines breiten Spektrums an Infektionsdosen auf die räumliche Infektionsdynamik dargestellt werden, dass die Infektions-Clearance, die sich für realistische Pilzbelastungen ergibt, bei Mäusen effizienter realisiert wird als im Menschen (Blickensdorf et al. 2019). Diese spezifischen Unterschiede sollten sorgfältig abgewogen sowie mögliche Einschränkungen bei der Übertragbarkeit von Untersuchungen an Mausmodellen auf den Menschen oder andere Säugetiere bedacht werden.

2.2.2. Das Hausschwein als translationales Tiermodell

Ein translationales Tiermodell zur Untersuchung insbesondere menschlicher Infektionskrankheiten sollte die verschiedenen Aspekte der Krankheit des jeweiligen Organismus genau reproduzieren. Hausschweine (*Sus scrofa domestica*) sind eng verwandt mit dem Menschen in Bezug auf Anatomie, Genetik und Physiologie und stellen daher ein geeignetes Tiermodell für die translationale Forschung bezüglich verschiedener mikrobieller Infektionskrankheiten dar. Die Verwendung von Schweinen als Tiermodelle in zahlreichen Studien hat somit bereits zum Erwerb neuer Erkenntnisse zur Verbesserung der Gesundheit von Mensch und Tier beigetragen (Meurens et al. 2012).

2.2.2.1. Vergleichende Aspekte der Anatomie

Insbesondere bei der Untersuchung pulmonaler Erkrankungen durch luftgetragene Pathogene spielt die vergleichende Anatomie des Atemtraktes von Mensch und Schwein eine wesentliche Rolle. Die morphologische Struktur und Verteilung der Atemwege von Schweinen variiert je nach Alter und Schweinerasse, sind jedoch in Bezug auf die Struktur des Tracheobronchialbaumes, die Lungenphysiologie und -größe (Judge et al. 2014) sowie die Anzahl der submukosalen Drüsen der Atemwege (Choi et al. 2000) eng mit denen des Menschen verwandt. Die linke Lunge des Schweins ähnelt der linken Lungenhälfte des Menschen, da sie aus einem cranialen Lobus (Lobus cranialis sinister) und einem caudalen Lobus (Lobus caudalis sinister) besteht. Der linke craniale Lobus teilt sich in kraniale und kaudale segmentale Bronchien (Pars craniales und Pars caudalis). Dies ähnelt der Aufteilung in Lungenoberlappen (Lobus superior pulmonis sinistri) und Lungenunterlappen (Lobus inferior pulmonis sinistri) beim Menschen. Der linke kaudale Bronchus teilt sich in vier dorsale und vier ventrale segmentale Bronchien, die den linken kaudalen Lappen beatmen. Im Gegensatz zur menschlichen rechten Lunge mit drei Lappen ist die rechte Lunge des Schweins in vier Lappen unterteilt (Lobus cranialis dexter, Lobus medius, Lobus caudalis dexter, Lobus accessorius). Dem rechten cranialen Lappen dient ein cranialer (trachealer) Bronchus, der von der rechten Wand der Luftröhre (Trachea) proximal der Bifurkation ausgeht. Der Bronchus des cranialen Lappens unterteilt sich dann in kraniale und kaudale segmentale Bronchien (Nakakuki 1994; Judge et al. 2014). Ein Trachealbronchus beim Menschen entspricht dagegen einem atypischen trachealen Bronchusabgang oder einem überzähligen Bronchus, der direkt aus der in der Regel rechtslateralen Wand des distalen Tracheadrittels entspringt (Findik 2011). Wie viele Säugetierarten, einschließlich Schweinen, besitzt die menschliche Lunge im Gegensatz zu Mäusen ein ausgedehntes interlobuläres und intralobuläres Bindegewebe, das die Hauptgefäße und Bronchien mit der pleuralen Oberfläche verbindet (Meurens et al. 2012). Auch die oberen Atemwege von Schweinen und Menschen sind sich anatomisch ähnlich. Der

menschliche Waldeyer-Rachenring – eine Ansammlung von lymphatischem Gewebe im Bereich von Mund-, Nasenhöhle und Pharynx – ähnelt neben den Primaten am ehesten der anatomischen Anordnung lymphoiden Gewebes im Nasopharynx des Schweines (Horter et al. 2003). Zudem besitzen Schweine Tonsillen, die wiederum bei Mäusen fehlen (Meurens, Summerfield et al. 2012). Die histologischen Strukturen in den Atemwegen von Mensch und Schwein sind ebenfalls vergleichbar. Im Gegensatz zu anderen Tieren (z. B. Hunden) befinden sich in den Bronchien von Schweinen eine große Anzahl von submukosalen Drüsen. Dies ist ein wichtiger Faktor für die Entwicklung von Großtiermodellen für entzündliche Atemwegserkrankungen sowie Mukoviszidose. Die Anatomie der Atemwege entscheidet letztlich auch über die Deposition von inhalierten Aerosolen in der Lunge (Phalen et al. 2008; Windt et al. 2010), was insbesondere bei der Betrachtung der aerogenen Übertragung von Pilzkonidien von Bedeutung ist.

2.2.2.2. Vergleichende Aspekte des Immunsystems

Das Immunsystem von Schweinen wurde in den vergangenen Jahren genau charakterisiert und bietet eine breite Palette etablierter Methoden und Werkzeuge für immunologische Fragestellungen (Meurens et al. 2012; Saalmüller und Gerner 2016). Aufgrund der Ähnlichkeiten bezüglich der Zusammensetzung der Immunzellen im Blut, der Funktion der angeborenen Immunzellen, der funktionellen T-Zell-Untergruppen sowie der Zytokinsekretion, stellt das Schwein ein relevantes Modell zur Untersuchung von Infektionserkrankungen des Menschen dar (Meurens et al. 2012). Neben einigen schweinespezifischen Polypeptiden der Wirtsabwehr oder des Fehlens von α -Defensinen, ähneln die meisten Proteine des Immunsystems strukturelle und funktionell denen des Menschen (Sang et al. 2009). Über 80 % der von Dawson et. al. analysierten Parameter des porzinen Immunsystems entsprachen eher denen des Menschen, wohingegen Mäuse in nur weniger als 10 % dem Menschen ähnlicher waren (Dawson 2012). Im Gegensatz zu Mäusen besitzen Schweine einen dem Menschen ähnlichen Anteil von 50 bis 70 % an neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut (Fairbairn et al. 2011). Entsprechend den Beobachtungen im Menschen bezüglich der angeborenen Immunantwort gegenüber Infektionserregern gibt es zudem keine Hinweise auf die Stickstoffmonoxid-Produktion durch porzine Makrophagen nach Lipopolysaccharid (LPS) - Stimulation, wie in der Maus jedoch beschrieben ist (Pampusch et al. 1998). Bei Schweinen und Menschen sind die Toll-like Rezeptoren TLR7 und TLR9 hauptsächlich auf plasmazytoide dendritische Zellen (DCs) beschränkt, währenddessen sie auch auf konventionellen DCs von Mäusen exprimiert sind (Shortman und Liu 2002; Summerfield und Mccullough 2009). Bezüglich der erworbenen Immunität konnten im Schwein funktionelle Gegenstücke zu allen Zytokinen und entsprechenden Zellen innerhalb der Th1-, Th2-, Th17 sowie Treg-

Differenzierung identifiziert werden (Saalmüller und Gerner 2016). Auch IL-8, ein chemotaktischer Lockstoff für neutrophile Granulozyten, wurde im Schwein nachgewiesen, nicht jedoch in der Maus (Fairbairn et al. 2011; Asfaha et al. 2013).

Seit der Veröffentlichung einer umfassenden Zusammenfassung porziner CD-Antigene im Jahr 2008 (Piriou-Guzylack und Salmon, 2008) wurde zudem die Sequenzierung und Analyse des Schweinegenoms veröffentlicht (Groenen et al., 2012). Dementsprechend wurde die CD-Nomenklatur des Schweins basierend auf den Genomdaten sowie alle verfügbaren Reagenzien aktualisiert, die mit porzinen CD-Markern reagieren, einschließlich schweinspezifischer monoklonaler und polyklonaler Antikörper, aber auch kreuzreaktiver Antikörper verschiedener Spezies (Dawson und Lunney, 2018a). Zudem wurde 2019 eine Website mit Antikörpern, die für immunverwandte Moleküle in Schweinen und anderen Tierarten spezifisch ist, öffentlich zugänglich (<https://www.immunologicaltoolbox.co.uk/>). Die „DGIL Porcine Translational Research Database“ stellt eine weitere Datenbank dar, die neben der Verfügbarkeit von Antikörpern umfassende Informationen zu PCR-Primern sowie Daten zur porzinen Gen- und Proteinexpression zusammenfasst (Dawson et al. 2007). Für die Durchflusszytometrie existieren somit eine Vielzahl von schweinespezifischen sowie kreuzreaktiven Antikörpern zur Identifizierung und Charakterisierung verschiedener Immunzellpopulationen (Dawson und Lunney 2018). Zudem wurde der Nachweis des Aktivierungsmarkers CD154 (CD40L) auf porzinen T-Zellen unter Verwendung eines kreuzreaktiven humanen CD154-Antikörpers (Klon 5C8) zur Identifizierung und Charakterisierung von Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Schwein etabliert. Die Ex-vivo-Analyse porziner PBMCs zeigte, dass CD154 von CD4⁺ T-Zellen bei Stimulation mit bakteriellem Superantigen (SEB) oder Lysaten eines Kommensalpilzes (*C. albicans*), aber auch nach TCR-unabhängiger Stimulation mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und Ionomycin exprimiert wird (Ebner et al. 2017). Mit den derzeit verfügbaren Tools konnte jedoch die SLAI-TCR-Wechselwirkung nicht direkt nachgewiesen werden, wie bereits in Studien an Mäusen und Menschen gezeigt wurde (Kirchhoff et al. 2007; Bacher et al. 2016). Jedoch in Übereinstimmung mit Untersuchungen an humanem PBMCs konnte gezeigt werden, dass CD154 im Schwein mit funktionell wichtigen Zytokinen wie IFN- γ oder TNF- α koexprimiert wird (Ebner et al. 2017). Dies ermöglicht zukünftig die Untersuchung der adaptiven T-Helferzellantwort von Schweinen auf ein definiertes Pathogen und stellt eine wesentliche Voraussetzung zur Analyse *Aspergillus*-spezifischer T-Helferzellen im Schwein dar.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Gerät	Hersteller
accu-jet® pro Pipettierhelfer	BRAND, Wertheim, Deutschland
BD FACSAria™ II, Zellsortiersystem	BD Biosciences, CA, USA
BD FACSCanto™ II, Durchflusszytometer	BD Biosciences, CA, USA
Breitband-Ultraschallgenerator	Sono-Tek Corporation, Milton, NY, USA
Casy® Cell counter Model TT	Roche, Basel, Schweiz
Heracell™ 240i CO2 Inkubator	ThermoScientific, Schwerte, Deutschland
Impinger AGI-30	Neubert-Glas, Geschwenda, Deutschland
Inverses Mikroskop, Primovert	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Laminar Flow Mars 1200, Laborwerkbank	LaboGene, Lillerød, Dänemark
MACS®-Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop (compound), Leica DM750	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskopkamera, Leica ICC50 HD	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
MiniMACS®/OctoMACS® Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
NanoDrop ND 1000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Perfusionspumpe	LAMBDA Instruments, Baar, Schweiz
Pipette, einstellbar (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette, mehrstufig	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Stereomikroskop, Leica M50	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Thermostatschrank	AQUALYTIC, Dortmund, Deutschland
Vakuumpumpe	Edwards, Burgess Hill, United Kingdom
VortexGenie® 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	Lauda-Brinkmann, Delran, NJ, USA
Wasserbad, Brunswick™ Innova®3100	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5454R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810/5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge cell spin I	Tharmac, Waldsolms, Deutschland

Tab. 3.1 Liste der Laborgerät

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
BD Plastipak™ Luer-Lok™-Spritze, 50 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Biopsie-Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
C-Chip®, Neubauer Einweg-Zählkammer	NanoEntek, Seoul, Südkorea
Cellstar® Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Combitips (0,5 ml; 2,5 ml; 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Costar® Stripette-Pipetten (10 ml, 25 ml)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
CryoPure 2,0 ml Röhren	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cutfix® Chirurgische Einmal-Skalpelle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Eppendorf Tubes (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Extension Line Type Heidelberger, 75 cm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon™ Zellsiebe (40 µm, 70 µm)	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Injekt® Einmalspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Mikrotiterplatten, 12 well, Flachboden	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Mikrotiterplatten, 12 well, Flachboden	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Mikrotiterplatten, 96 well, Rundboden	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Mikrotiterplatten, 96 well, V-Boden	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Monovette® Serum mit Granulat, 9,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multiply®-Pro Gefäß, 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Neopoint® Einmal-Kanülen, 20G, 70 mm	Servoprax, Wesel, Deutschland
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen, 94 x 16 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen, 1000 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, 10 µl	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Plattierungsspatel	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhre, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen mit Zellsieb, 5 ml	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Sektionsinstrumente	KLS, Martin, Freiburg, Deutschland
S-Monovette® 9 ml, Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Spezialpipetten nach Thoma	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Sterican® Einmal-Kanülen, 20 G, 40 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Transferpipetten, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tab. 3.2 Liste der Verbrauchsmaterialien

3.1.3. Pharmazeutika, Chemikalien und Reagenzien

Pharmazeutikum/Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Amoxicillin, 150 mg/ml Injektionssuspension (Duphamox® LA)	Zoetis Deutschland, Berlin, Deutschland
Azaperon, 40 mg/ml Injektionslösung (Stresnil®)	Elanco, Cuxhaven, Deutschland
Cyclophosphamid, 50 mg Tabletten (Endoxan®)	Baxter Oncology, Halle/Westfalen, Deutschland
Embutramid/Mebenzoniumjodid/Tetracain, 200 mg/50 mg/5 mg je ml Injektionslösung (T61®)	Intervet (MSD Tiergesundheit), Unterschleißheim, Deutschland
Gentamicin, 50 mg/ml	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ketamin, 100 mg/ml Injektionslösung (Ursotamin®)	Serumwerk Bernburg, Bernburg (Saale), Deutschland
Methylprednisolon, 40 mg Tabletten (Urbason®)	Sanofi-Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland
Penicillin-Streptomycin, 10,000 U/ml – 10 mg/ml	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
2-Propanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung 4 % (ROTI®Histofix)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pancoll human	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Percoll®	Cytiva, Uppsala, Schweden
Albumin (BSA) Fraktion V	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Collagenase D	Roche, Basel, Schweiz
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Fetales Rinderserum (FBS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Liberase DH	Roche, Basel, Schweiz
Liberase TL	Roche, Basel, Schweiz

Tab. 3.3 Liste der Pharmazeutika, Chemikalien und Reagenzien

3.1.4. Kommerzielle Sets

Set	Hersteller
eBioscience™ Foxp3/Transkriptionsfaktor Färbepufferset	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Haema Schnellfärbung „Diff-Quick“	Labor+Technik Eberhard Lehmann, Berlin , Deutschland
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QIAamp UltraSens Virus Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tab. 3.4 Liste der kommerziellen Sets

3.1.5. Stimulatoren und Inhibitoren

Stimulator/Inhibitor	Hersteller
<i>A. fumigatus</i> -Lysat	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
<i>C. albicans</i> -Lysat	Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA
eBioscience™ Brefeldin A Solution (1000X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
eBioscience™ Monensin Solution (1000X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS) L5529	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Staphylococcal enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tab. 3.5 Liste der Stimulatoren und Inhibitoren

3.1.6. Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zytokin/Wachstumsfaktor	Hersteller
rekombinantes porcines IL4	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes porcines TNF- α	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rekombinantes porcines GM-CSF	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Tab. 3.6 Liste der Zytokine und Wachstumsfaktoren

3.1.7. Medien, Lösungen und Puffer

Medium/Lösung	Hersteller
DPBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
IMDM	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Malzextrakt-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

Tab. 3.7 Liste der kommerziellen Medien und Lösung

Medium/Lösung	Zusammensetzung
complete IMDM (cIMDM)	IMDM 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
wash RPMI	RPMI 1640 1 % FBS 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
wash RPMI (Lunge)	RPMI 1640 100 U/ml Penicillin 100 μ g/ml Streptomycin
Spüllösung (BAL)	DPBS 5 mM EDTA
Physiologische NaCl-Lösung (0,9%)	Destilliertes Wasser 9 g/l NaCl

FACS/MACS-Puffer	DPBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
Erythrozytenlyse-Puffer	Destilliertes Wasser 0,01 M KHCO ₃ 155 M NH ₄ ClO 1 mM EDTA

Tab. 3.8 Liste der hergestellten Medien, Lösungen und Puffer

3.1.8. Monoklonale Antikörper, Zellfarbstoff und magnetische Mikrobeads

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller
CD3ε	PerCP-Cy5.5	BB23-8E6-8C8	IgG2a	BD Biosciences
CD4α	AlexaFluor® 647	4-12-4	IgG2b	BD Biosciences
	PE-Cy7	4-12-4	IgG2b	BD Biosciences
	PerCP-Cy5.5	4-12-4	IgG2b	BD Biosciences
CD8α	FITC	76-2-11	IgG2a	BD Biosciences
IFN-γ	PE	P2G10	IgG1	BD Biosciences
	AlexaFluor® 647	P2G10	IgG1	BD Biosciences
CD27	PE	B30C7	B30C7	Bio-Rad

Tab. 3.10 Liste der Schwein-spezifischen monoklonalen Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller
CD14	Viogreen	Tük4	IgG2a	Miltenyi Biotec
CD154	PE	5C8	IgG2b	Miltenyi Biotec
	PE-Vio770	5C8	IgG2b	Miltenyi Biotec
	VioBlue	5C8	IgG2b	Miltenyi Biotec
TNF-α	Pacific Blue	Mab11	IgG1	BioLegend
	APC-Cy7	Mab11	IgG1	BioLegend
IL-17A	AlexaFluor® 647	SCPL1362	IgG1	BD Biosciences
IL-4	PE-Cy7	MP4-25D2	IgG1	BioLegend
T-bet	PE-Cy7	eBio4B10	IgG1	Thermo Fisher

GATA3	PE	TWAJ	IgG2b	Thermo Fisher
FoxP3	eFluor 450	FJK-16s	IgG2a	Thermo Fisher
Ki-67	PE-Cy7	SolA15	IgG2a	Thermo Fisher

Tab. 3.11 Liste der kreuzreaktiven Mensch- oder Maus-spezifischen Antikörper

Zellfarbstoff	Hersteller
eBioscience™ fixierbarer Viabilitätsfarbstoff eFluor™ 506	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
eBioscience™ CFSE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tab. 3.12 Liste der Zellfarbstoffe

Mikrobeads	Hersteller
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tab. 3.13 Liste der magnetischen Mikrobeads

3.1.9. Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva™ 8.0	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
FlowJo® V10	Tree Star, Ashland, USA
GraphPad Prism 7.03	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Inkscape 0.92.3	Software Freedom Conservancy, Brooklyn, NY, USA
StepOnePlus™ Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tab. 3.14 Liste der angewandten Software

3.2. Methoden

3.2.1. Ethikerklärung

Die Studie wurde gemäß den Grundsätzen des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere sowie des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Genehmigung wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo, Berlin, Deutschland) für die Entnahme von Blut- und Lungengewebe von gesunden Schweinen (T0002/17) sowie für die experimentelle Exposition (Zulassungsnummer G0381/17) von gesunden und immungeschwächten Schweinen erteilt.

3.2.2. Tiere, Probennahme und Sektion

Zur Detektion und Analyse von *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen bei Tieren aus konventioneller Tierhaltung wurde Blut in sterilen Lithiumheparin-haltigen Röhrchen bei gesunden Hybridschweinen (Kreuzung: Deutsche Landrasse, Deutsche Edelrasse) unterschiedlichen Alters und Geschlechts an der Vena cava cranialis oder durch Punktion des Herzens nach Narkotisierung mit Ketaminhydrochlorid und Azaperon (20 mg/kg i.m. und 2 mg/kg i.m.) entnommen. Lungengewebe wurde nach beschriebener Narkotisierung sowie Euthanasierung durch intrakardiale Injektion von Tetracainhydrochlorid, Mebezoniomiodid und Embutramid (10 mg/kg T61) extrahiert.

Zur Analyse der pilzspezifischen Immunantwort infolge einer definierten *Aspergillus*-Exposition wurden kastrierte männliche Hybridschweine im Alter von 5 Wochen aus konventioneller Tierhaltung erworben. Nach 14-tägiger Eingewöhnungsphase wurden die Tiere nach erfolgter Blutentnahme über die Vena cava cranialis einer definierten Konzentration (10^6 KbE/m³) von aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien in der Luft für 8 Stunden in einer Aerosolkammer exponiert. Nach der experimentellen *Aspergillus*-Exposition wurden die Schweine von verbleibenden Aerosolniederschlägen auf ihrer Haut befreit und zurück in ihre Ställe verbracht.

Eine temporäre Immunsuppression der Schweine wurde erzielt, indem die Tiere täglich eine Kombination aus Cyclophosphamid und Methylprednisolon (10 mg/kg p.o. und 4 mg/kg p.o.) erhielten, die begonnen 6 Tage vor der experimentellen *Aspergillus*-Exposition für insgesamt 8 Tage oral verabreicht wurden. Zudem wurde den Tieren Amoxicillin intramuskulär (15 mg/kg) jeden zweiten Tag appliziert.

Während der experimentellen *Aspergillus*-Exposition wurde die Aerosolkammer mit Gummimatten und einem Wasserbehälter ausgestattet. Nach einem Beobachtungszeitraum von 4 Tagen bzw. 10/11 oder 18/19 Tagen mit regelmäßiger Blutentnahme über die Vena cava

cranialis (an den Tagen 2, 4, 6, 11, 13) wurden die Schweine mit Ketaminhydrochlorid und Azaperon (20 mg/kg i.m. und 2 mg/kg i.m.) narkotisiert. Nach Blutentnahme mittels Herzpunktion erfolgte die Euthanasie durch Verabreichung von Tetracainhydrochlorid, Mebezoniomiodid und Embutramid (10 mg/kg T61) intrakardial sowie die Sektion und Probenentnahme. Für die bronchoalveoläre Lavage wurden 100 ml DPBS, welches mit 5 mM EDTA versetzt war, in die isolierte Lunge eingebracht und anschließend wieder abgesaugt. Gewebeproben wurden aus dem Lobus cranialis dexter, Lobus medius, Lobus caudalis dexter, Lobus caudalis sinister, Lobus cranialis sinister (Pars caudalis und Pars cranialis) sowie dem Lobus accessorius der Lunge entnommen. Darüber hinaus wurde Gewebematerial der Lnn. tracheobronchiales cranialis, Lnn. tracheobronchiales dextri, Lnn. tracheobronchiales medii sowie Lnn. tracheobronchiales sinistri gesammelt. Ggf. erfolgte zudem die Entnahme von Milzgewebe.

3.2.3. Experimenteller Ablauf der *A. fumigatus*-Aerosolisierung

Die experimentelle Exposition der Schweine gegenüber luftgetragenen Konidien von *A. fumigatus* (Stamm ATTC46645) wurde in einer Aerosolkammer aus rostfreiem Stahl mit einer Grundfläche von 3,2 m² und einem Volumen von 7 m³ sowie bei definierten klimatischen Parametern (relative Luftfeuchtigkeit 70%, Temperatur 26°C, Luftstrom 100 m³/h) (Rosen et al. 2018) durchgeführt (Abb. 3.1). Die angewandte *A. fumigatus*-Konidiensuspension wurde durch Ausplattieren von Konidien auf *Aspergillus*-Minimalmedium, das 50 mM Glucose enthielt, und anschließender 3-tägiger Kultivierung bis zur Sporulation bei 37 °C erzeugt. Die Konidien wurden in sterilem Wasser geerntet und durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Zur Aerosolisierung wurde die Suspension in eine 50 ml-Spritze überführt und bei 4 °C gelagert. Die Konidiensuspension wurde über eine Perfusionspumpe transportiert und mit einem an der Decke der Kammer installierten Ultraschallvernebler aerosolisiert. Das *Aspergillus*-Konidienaerosol wurde dann durch einen Axialventilator in der Kammer verteilt. In Voruntersuchungen zur Überprüfung der Luftkonzentrationen von *A. fumigatus*-Konidien wurden die Vorschubrate der Perfusionspumpe (36 ml/h) sowie die Konzentration der eingesetzten *A. fumigatus*-Konidiensuspension (5×10^7 /ml) definiert, um eine Luftkonzentration von 10^6 KbE/m³ an *Aspergillus*-Konidien konstant über 8 Stunden zu erreichen. Luftproben wurden im Rahmen der Voruntersuchungen an 3 verschiedenen Positionen (Höhe: 1,6 m; 0,8 m; 0,3 m) sowie während der Exposition der Tiere in zwei verschiedenen Höhen (1,6 m und 0,8 m) über dem Boden unter Verwendung eines AGI-30-Impingers, der mit 30 ml destilliertem, gefiltertem und autoklaviertem Wasser gefüllt war, an 2 Zeitpunkten (0,5 und 6 h nach Beginn der Aerosolisierung) entnommen. Ein Volumen von 100 µl des verbleibenden Wassers im Impinger wurde dreifach auf Malzextraktagar ausplattiert und 42 h bei 37 °C inkubiert. Die

Konzentration der in der Luft befindlichen Konidien wurde anhand der mittleren Anzahl koloniebildender Einheiten, der Menge des verbleibenden Wassers im Impinger, des Luftstroms und der Dauer der Luftprobenahme anhand der folgenden Gleichung berechnet:

Aerosolkonzentration (KbE/m³) =

$$\frac{\text{Konidienkonz. im Impinger* (KbE/ml)} \times \text{Menge des Restwassers im Impinger (ml)} \times 1000}{\text{Luftstrom (12,5 l/min)} \times \text{Probenahmedauer (30 min)}}$$

*Konidienkonz. im Impinger = Mittelwert der KbE \times Verdünnungsfaktor \times 10 (KbE/ml)

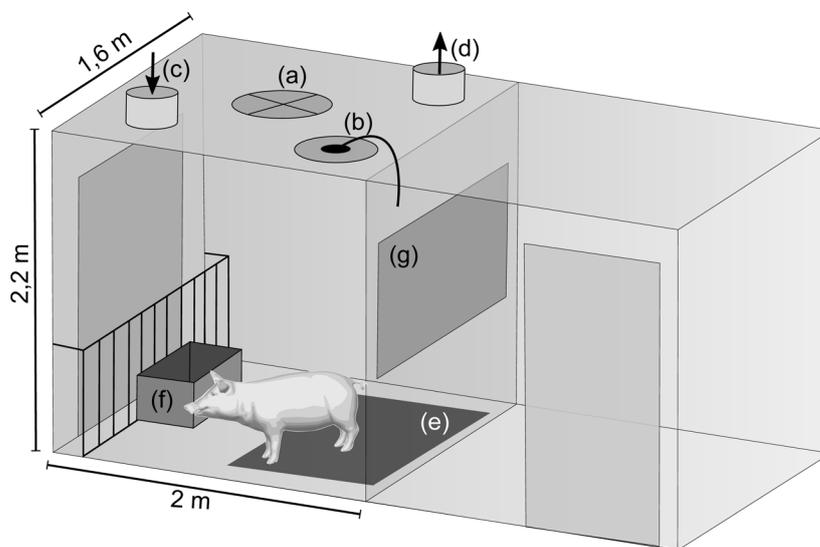


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Aerosolkammer für die *Aspergillus*-Exposition

Die experimentelle Exposition von Schweinen gegenüber luftgetragenen Konidien von *A. fumigatus* wurde in einer Aerosolkammer (links) aus rostfreiem Stahl mit einer Grundfläche von 3,2 m² und einem Volumen von 7 m³ sowie der technischen Fähigkeit zur Festlegung definierter Klimaparameter durchgeführt. Die *A. fumigatus*-Konidien suspension wurde mit einem an der Decke der Kammer installierten Ultraschallvernebler (b) aerosolisiert. Das *Aspergillus*-Aerosol wurde durch ein Axialventilator (a) in der Kammer verteilt. Zuluft und (c) Abluft (d) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Während der experimentellen *Aspergillus*-Exposition wurde die Aerosolkammer mit Gummimatten (e) und einem Wasserreservoir (f) ausgestattet. Nach experimenteller Exposition wurden die Schweine durch eine Durchreiche (g) in den angrenzenden Stall (rechts) verbracht.

3.2.4. Isolierung porziner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut, Lungengewebe, Lungenlymphknoten und Milzgewebe

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) wurden direkt am Tag der Blutentnahme durch Dichtegradientenzentrifugation von verdünntem Schweineblut (1:2 in 0,9%iger Kochsalzlösung) unter Verwendung von Pancoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) isoliert. Zur Gradientenisolierung von mononukleären Zellen der Lunge wurden 2×2 cm große Gewebeproben von 7 Stellen der porzinen Lunge entnommen und in wash RPMI-Medium (Lunge) gegeben, das 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt und anschließend in kleine Stücke zerteilt. Nach dem Waschen in 30 ml wash RPMI (Lunge) wurde der Verdau durch Resuspendieren des zerkleinerten Materials in RPMI-1640 durchgeführt, das mit 1% Penicillin/Streptomycin, 0,125 U/ml Kollagenase D, 0,180 mg/ml DNase I, 0,125 mg/ml Liberase DH und 0,125 mg/ml Liberase TM versetzt war. Das Material wurde insgesamt 2 h bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad (250 rpm) inkubiert. Dabei wurde das verdaute Gewebe bereits nach 1 h durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert und die gewonnene Zellsuspension bei 4 °C gelagert. Der noch unverdaute Anteil wurde abermals in das oben beschriebene Verdaumedium gegeben und für eine weitere Stunde bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad (250 rpm) inkubiert. Nach dem abschließenden Filtrieren und Waschen mit eiskaltem HBSS wurde eine Erythrozytenlyse unter Einsatz eines Erythrozytenlyse-Puffers für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Zellen wurden mit wash RPMI-Medium (Lunge) gewaschen und das Zellpellet wurde in 40-prozentige Percoll-Lösung resuspendiert und auf 70-prozentige Percoll-Lösung geschichtet. Nach Dichtegradientenzentrifugation bei 1500 rpm für 20 min bei RT wurden die mononukleäre Zellen an der Grenzfläche entnommen und gewaschen, ehe sie in Kulturmedium verbracht wurden. Leukozyten aus Lungenlymphknoten oder Milz wurden isoliert, indem Lymphknoten oder Milzgewebe durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben wurden, gefolgt von einer 5-minütigen Erythrozytenlyse und zusätzlichem Waschen in cIMDM.

3.2.5. Restimulation der mononukleären Zellen mit *A. fumigatus*-Lysat

Lyophilisierte Extrakte von *Aspergillus fumigatus* (ATTC 46645) wurden entweder von der Miltenyi Biotec GmbH bezogen oder aus gefrorenem Myzel erzeugt, wie von Bacher et. al. beschrieben (Bacher et al. 2014b). Zum Nachweis von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen wurden isolierte PBMCs, mononukleäre Zellen der Lunge oder Leukozyten aus Lungenlymphknoten in complete IMDM – welches 10% FBS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt – resuspendiert und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit *A. fumigatus*-Lysat (Asp, 40 µg/ml) für 6 h bei 37 °C und

5% CO₂ stimuliert. Brefeldin A wurde bereits nach 2 h Stimulation in einer Endkonzentration von 3 µg/ml zugegeben.

3.2.6. Antigen-reaktive Anreicherung von porzinen CD154⁺ T-Helferzellen

1-2×10⁷ mononukleäre Zellen aus Blut, Lunge oder Lungenlymphknoten wurden in 1 ml cIMDM resuspendiert, anschließend in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ ruhen gelassen. Am folgenden Tag wurden die Zellen über 5 h mit *A. fumigatus*-Lysat (Asp, 40 µg/ml) unter Zugabe eines CD154-PE-Antikörpers (1:50 Verdünnung, Klon 5C8) bei 37 °C sowie 5% CO₂ stimuliert. Nicht stimulierte Zellen (w/o) dienten als Negativkontrolle. Monensin (Endkonzentration: 2 µM) wurde nach 2-stündiger Stimulation zugegeben. Nach 5 h wurden die Zellen gesammelt und gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit Anti-PE-Mikrobeads für 15 Minuten bei 4 °C. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 1 ml cIMDM resuspendiert, das Brefeldin A (3 µg/ml) und Monensin (2 µM) enthielt, zurück in die 12-Well-Zellkulturplatten gegeben und weitere 2 Stunden inkubiert, um die intrazelluläre Zytokinfärbung zu ermöglichen. Die Zellen wurden anschließend gesammelt und mittels zweier aufeinanderfolgender MS-Säulen magnetisch angereichert. Die Oberflächenfärbung wurde auf der ersten Säule durchgeführt, gefolgt von der Fixierung und intrazellulären Färbung unter Verwendung des Inside-Färbungskits auf der zweiten Säule, wie von Bacher et al. (Bacher und Scheffold 2013; Bacher et al. 2013) beschrieben.

3.2.7. Expansion und autologe Restimulation von *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen

CFSE-markierte mononukleäre Zellen aus dem porzinen Lungengewebe wurden in cIMDM unter Zugabe von *A. fumigatus*-Lysat (40 µg/ml) über 7 Tage expandiert, gefolgt von zwei Ruhetagen. Parallel dazu wurden autologe CD14⁺ Monozyten in cIMDM mit einer Zelldichte von 4×10⁵ Zellen/Well in 96-Well-Platten ausgesät und unter Zugabe von rekombinantem prozinem GM-CSF (20 ng/ml) und Interleukin (IL) -4 (10 ng/ml) in von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen (MoDCs) innerhalb von 7 Tagen differenziert. Die MoDCs wurden mit *A. fumigatus* oder *C. albicans*-Antigen (40 µg/ml) beladen (1 Tag) und anschließend unter Zugabe von LPS (100 ng/ml) sowie rekombinantem porzinem TNF-α (25 ng/ml) über einen weiteren Tag maturiert. Zur *A. fumigatus* oder *C. albicans*-spezifischen Restimulation wurden die expandierten mononukleären Zellen der porzinen Lunge gesammelt, gewaschen und anschließend 200 000 Zellen/200 µl/Well zu gepimten und gereiften MoDCs für 6 Stunden gegeben. Brefeldin A (3 µg/ml) wurde für die letzten 4 Stunden der autologen Restimulation zugegeben.

3.2.8. Durchflusszytometrie

Die isolierten mononukleären Zellen wurden in verschiedenen Kombinationen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern für Analysen mittels Durchflusszytometrie angefärbt. Die angewandten schweinespezifischen sowie kreuzreaktiven Antikörper sind in Tabelle 3.10 und 3.11 aufgeführt. Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) wurde zur Überwachung proliferierender Zellen eingesetzt. Dazu wurden 10^6 Zellen in 1 ml verdünntem CFSE (1:1000 in DPBS) für 5 min bei 37 °C angefärbt und anschließend 2-malig in cIMDM gewaschen. Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff eFluor™ 506 wurde zudem zur Detektion toter Zellen verwendet. Zur Färbung von Oberflächenmarkern wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer und den jeweiligen Antikörpern für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und der Überstand entfernt. Für eine anschließende Messung wurden die angefärbten Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Zur intrazellulären bzw. intranukleären Färbung von Zytokinen, Transkriptionsfaktoren sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 wurden die Zellen entsprechend der Herstellerangaben fixiert und permeabilisiert mit dem Transkriptionsfaktor-Färbungspufferset (eBiosciences) oder dem Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec). Für eine anschließende Messung mittels BD FACSAria™ II sowie BD FACSCanto™ II wurden die angefärbten Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo® V10 Software.

3.2.9. Rekultivierung der bronchoalveolären Spülflüssigkeit

Ein Volumen von 100 µl der entnommenen BAL wurde dreifach auf Malzextraktagar ausplattiert und 42 h bei 37 °C inkubiert. Die Menge der in der Lunge befindlichen Konidien wurde anhand der mittleren Anzahl koloniebildender Einheiten sowie anhand des eingesetzten Volumens von 100 ml Spülflüssigkeit errechnet.

3.2.10. Histologische Untersuchung des Lungengewebes

Für die histologische Untersuchung wurden Gewebeproben aus dem Lobus cranialis dexter, Lobus medius, Lobus caudalis dexter, Lobus caudalis sinister, Lobus cranialis sinister (Pars caudalis und Pars cranialis) sowie dem Lobus accessorius der Lunge entnommen, in Formalinlösung über 6 Stunden bei Raumtemperatur fixiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und die Schnitte wurden mittels PAS-Reaktion (Periodic acid-Schiff reaction) sowie mit dem Anti-*Aspergillus*-Antikörper „ab20419“ immunhistochemisch gefärbt.

3.2.11. Pilz-DNA-Extraktion aus bronchoalveolärer Lavage und Serum

Die BAL-Proben wurden mittels Vortexer gemischt und 0,5 ml BAL-Flüssigkeit wurde 5 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt. Das verbleibende Pellet wurde 90 Sekunden lang unter Verwendung von Keramikperlen aufgeschlossen. Unter Verwendung eines kommerziellen Extraktionskits wurden beide Fraktionen wie zuvor beschrieben kombiniert und extrahiert (Springer et al. 2018). Das Elutionsvolumen wurde auf 70 µl eingestellt.

Aus Serumproben (1 ml) wurde unter Verwendung des QIAamp® UltraSens® Virus Kits mit der folgenden Modifikation DNA extrahiert: a) es wurde keine Träger-RNA verwendet, b) die Lysatzentrifugation wurde auf 3000 g eingestellt und c) das Elutionsvolumen wurde auf 35 µl eingestellt. In jedem DNA-Extraktionslauf wurden eine Negativkontrolle (Humanserum) und ein *Bacillus*-positives Serum (mit 10 000 Plasmidkopien von *Bacillus subtilis*-DNA versetzt) als Qualitätskontrollen eingeschlossen (Springer et al. 2016).

3.2.12. *Aspergillus*-spezifische Real-time-PCR

Ein *Aspergillus*-spezifischer Real-Time-PCR-Assay (Springer et al. 2011; Springer et al. 2012) wurde zur Detektion der Pilz-DNA angewandt. 20 µl Reaktionsmischung enthielten 0,3 µM Primer, 0,15 µM Hydrolysesonde, 10 µl TaqMan™-Genexpressions-Mastermix (Applied Biosystems™) und 5 µl Matrizen-DNA. Die Amplifikation wurde in einer StepOnePlus-Maschine (Applied Biosystems™) mit den folgenden Schritten durchgeführt: 50 ° C für 2 min, 95 ° C für 10 min, 60 Zyklen von 95 ° C für 5 s, 54 ° C für 15 s (Detektionsschritt) und 72 ° C für 1 s. Negative und positive PCR-Kontrollen wurden in jeden Lauf eingeschlossen. Die Proben wurden doppelt analysiert. In jedem DNA-Extraktionslauf wurde eine Negativkontrolle (DNA-freies Wasser, das mit 5 000 Plasmidkopien von *B. subtilis*-DNA versetzt war) als Qualitätskontrolle eingeschlossen. Neben Pilz-DNA wurde *B. subtilis*-DNA nachgewiesen. Diese interne Kontrolle wurde unabhängig vom Pilz-Target (Monoplex) getestet, jedoch innerhalb desselben PCR-Laufs. Neben der Verwendung als Extraktionskontrolle wurde auch *B. subtilis*-DNA zur Überwachung der PCR-Inhibition verwendet. Zu diesem Zweck wurden 1000 Plasmidkopien von *B. subtilis*-DNA in jeder PCR-Reaktion eingesetzt. Eine Inhibition wurde angenommen, wenn sich der Cq-Wert der Probe um mehr als 3,3 von den Kontrollen unterschied (Springer et al. 2018).

3.2.13. Leukozytenzählung und Differentialblutbild

Vollblut wurde 1:20 mit einer 3-prozentigen Essigsäurelösung in einer Spezialpipette nach Thoma verdünnt und in eine Einmal-Zählkammer (C-Chip®) verbracht. Die Leukozyten wurden manuell ausgezählt. Die Blutausrichthe wurden mit dem HAEMA Quick-Stain-Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers luftgetrocknet, fixiert und gefärbt. Die differentielle Zellzählung wurde an 200 Zellen pro Objektträger durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Detektion und Charakterisierung *A. fumigatus*-reaktiver Th-Zellen in Blut und Lungengewebe konventionell gehaltener Schweine

Hausschweine in konventioneller Tierhaltung sind permanent luftgetragenen Sporen von *A. fumigatus* ausgesetzt (Kristiansen et al. 2012). Zur Erfassung des natürlich erworbenen *A. fumigatus*-spezifischen T-Zell-Pools gesunder Schweine wurden Blutproben von Tieren unterschiedlicher Altersgruppen untersucht. Zur Detektion *A. fumigatus*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen wurde der beim Schwein bereits beschriebene Aktivierungsmarker CD154 (CD40L) angewandt (Ebner et al. 2017). Nach 6-stündiger Stimulation mit *A. fumigatus*-Lysat (Asp) wurde die Population *A. fumigatus*-reaktiver CD4⁺ T Zellen mittels intrazellulärer Färbung von CD154 in Abgrenzung zur unstimulierten Kontrolle (w/o) detektiert (Abb. 4.1A). *A. fumigatus*-reaktive CD4⁺ T-Zellen konnten in Tieren der Altersgruppen Läufer bzw. Mastschweine (1-6 Monate) sowie bei ausgewachsenen Sauen (> 6 Monate) nachgewiesen werden. Die Frequenz porciner *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen im Blut von 0.0736 ± 0.0344 % (Läufer/ Mastschweine) sowie 0.1457 ± 0.0749 % (ausgewachsene Sauen) spiegelt dabei die im gesunden Menschen beschriebenen Gegebenheiten wieder (Abb. 4.1B) (Bacher et al. 2014b). Allerdings konnte im Blut von Absatzferkeln im Alter von 3-4 Wochen keine *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen detektiert werden (Abb. 4.1B).

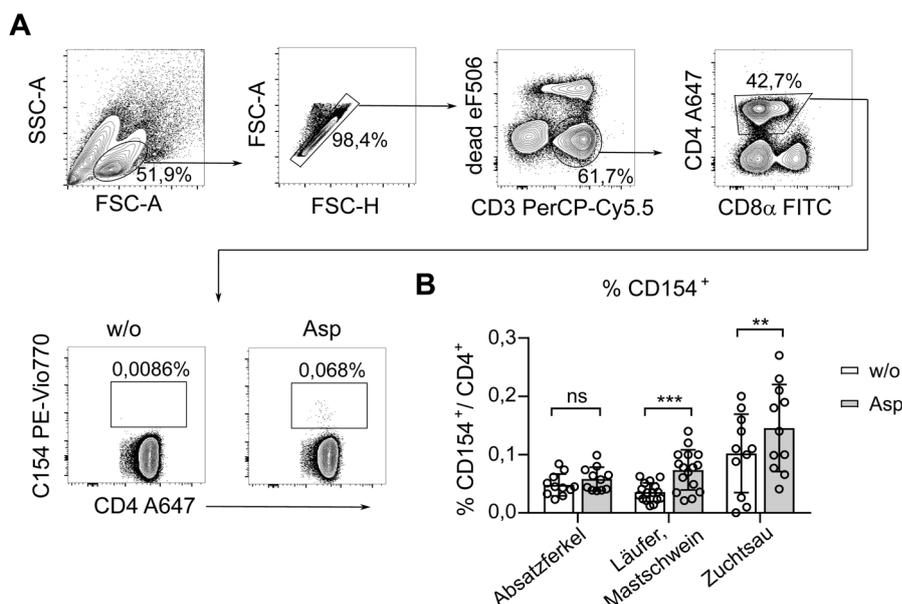


Abb. 4.1 Altersabhängige Detektion *A. fumigatus*-reaktiver T-Helferzellen in gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung mittels Durchflusszytomtrie

(A und B) Ex-vivo-Nachweis von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach kurzzeitiger (6-stündiger) antigener Stimulation (A) Gating-Strategie zur Identifizierung von CD154⁺ *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen in PBMCs. Frequenzen der CD154⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen sind entweder für nicht stimulierte (w/o) oder stimulierte (*A. fumigatus* Lysat, Asp, 40 µg/ml) PBMCs angegeben. (B) Altersabhängige Frequenzen von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen im Blut von Schweinen konventioneller Haltung unterschiedlicher Alterskategorien (Absatzferkel <1 Monat, n=11; Läufer und Mastschweine 1-6 Monate, n=16; Zuchtsau > 6 Monate, n=11) dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD, two-tailed paired t-test.

T-Helferzellen (CD4⁺ T-Zellen) lassen sich anhand ihres Zytokinprofils in unterschiedliche Subgruppen einteilen (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg und Tfh) (Raphael et al. 2015). Flowzytometrische Analysen *A. fumigatus*-reaktiver CD4⁺ T-Zellen von gesunden, natürlich gegenüber luftgetragenen *Aspergillus*-Sporen exponierten Schweinen ergaben eine vorherrschende Expression von TNF-α und IFN-γ und nur zu einem geringen, gegenüber unstimulierten Kontrollen nicht signifikanten Prozentsatz von IL-17A (Abb. 4.2A, B, C und D). Dahingegen konnte keine IL-4-Expression porziner *Aspergillus*-spezifischer Th-Zellen detektiert werden (Abb. 4.2E). Dies entspricht einem charakteristischen Th1-Phänotyp mit einem geringen Anteil an Th17-Zellen, was sich wiederum mit Analysen *A. fumigatus*-reaktiver CD4⁺ T-Zellen in gesunden Menschen deckt (Bacher et al. 2019). Um den Differenzierungs- bzw. Aktivierungsstatus der porzinen pilzspezifischen CD4⁺ T-Zellen zu bestimmen, wurde die Koexpression der Marker CD8α bzw. CD27 analysiert sowie mit derer nicht Antigen-spezifischer CD154⁻ CD4⁺ T-Zellen in Läufern bzw. Mastschweinen verglichen (Abb. 4.2F). Dabei zeigte sich, dass ein geringer Anteil der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen zum Kompartiment der CD8α⁺CD27⁺ zentralen Gedächtniszellen (durchschnittlich 9.42% der CD154⁺ T-Zellen) sowie der CD8α⁺CD27⁻ Effektor-Gedächtniszellen (durchschnittlich 29,3 % der CD154⁺ T-Zellen) zugeordnet werden kann (Reutner et al. 2013). Bei dem weitaus größeren Anteil porziner *A. fumigatus*-reaktiver CD4⁺ T-Zellen (durchschnittlich 54 % der CD154⁺ T-Zellen) handelte es sich jedoch – ähnlich wie im Menschen beschrieben (Bacher et al. 2014a) – T-Zellen des naiven Kompartiments (CD8α⁻CD27⁺).

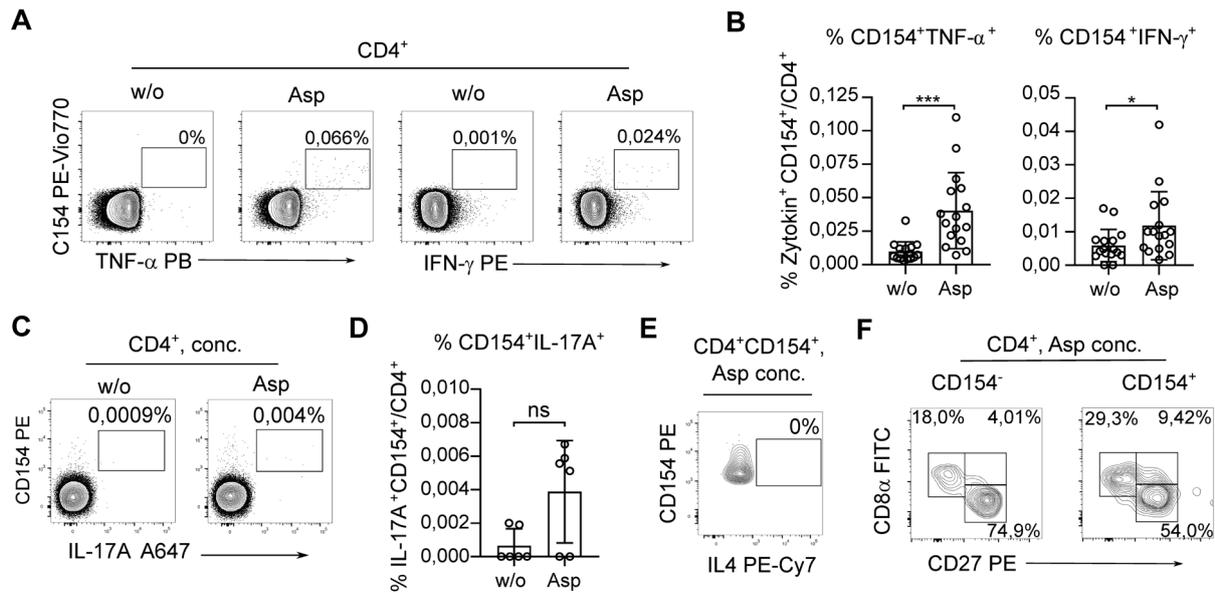


Abb. 4.2 Gesunde Schweine aus konventioneller Tierhaltung besitzen sowohl naive als auch Th1-Zytokin-sezernierende *A. fumigatus*-reaktive CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut (A-D) Ex-vivo-Nachweis von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach kurzzeitiger (6-stündiger) antigener Stimulation (A und B) Zytokinproduzierende *A. fumigatus*-reaktive CD154⁺ T-Zellen von nicht stimulierten (w/o) oder stimulierten (Asp, 40 μ g/ml) PBMCs für TNF- α ⁺CD154⁺ (links) und IFN- γ ⁺CD154⁺ (rechts) sind statistisch zusammengefasst in (B) für n=16 Schweine im Alter von 1 bis 6 Monaten, dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (C) Analyse der Expression von IL-17A von nicht stimulierten (w/o) PBMCs und *A. fumigatus*-reaktiven CD154⁺CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Lysat. Konkatenierte Konturdiagramme (von n=6 gesunden Tieren im Alter von 2,5 Monaten) zeigen den Prozentsatz der CD154⁺IL-17A⁺ Zellen aus den CD4⁺-T-Helferzellen und sind in (D) statistisch dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (E) Analyse der Expression IL-4 von *A. fumigatus*-reaktiven CD154⁺CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Lysat. Konkatenierte Konturdiagramme (von n=6 gesunden Tieren im Alter von 2,5 Monaten) zeigen den Prozentsatz der IL-4⁺ Zellen aus den CD154⁺-T-Helferzellen (F) Analyse der CD8 α - und CD27-Koexpression von *A. fumigatus*-reaktiven CD154⁺ CD4⁺ T-Zellen (rechtes Feld) im Vergleich zu CD154⁻CD4⁺ T-Zellen (linkes Feld) nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Lysat. Konkatenierte Konturdiagramme (von n=4 gesunden Tieren im Alter von 3 Monaten) zeigen die Frequenz von CD8 α ⁺CD27⁻ (Effektor-Gedächtnis-T-Zellen), CD8 α ⁺CD27⁺ (zentrale Gedächtnis-T-Zellen) und CD8 α ⁻CD27⁺ (naive T-Helferzellen).

Die Tatsache, dass *A. fumigatus*-Konidien mit einer Größe von 2-3 μ m die Lungenalveolen eines heranwachsenden Schweines erreichen, lässt eine starke pilzspezifische T-Zellantwort

lokal in der Lunge konventionell gehaltener Tiere vermuten. Daher wurden mononukleäre Zellen des Blutes mit denen im Lungengewebe bezüglich der CD154- und Zytokin-Koexpression nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Antigen verglichen. Die Frequenz *A. fumigatus*-reaktiver T-Zellen, welche aus Lungengewebe isoliert wurden, lag im Bereich von 0,023 bis 0,39 %, wobei aus dem Lungengewebe stammende T-Helferzellen in nicht stimulierten Kontrollen einen ausgeprägten CD154⁺ Hintergrund aufwiesen (Abb. 4.3A). Die Frequenz und Zytokinexpression unterschieden sich jedoch – wie auch teilweise für den Menschen beschrieben (Bacher et al. 2019) – nicht signifikant, wenn der nicht stimulierte CD154⁺ Hintergrund subtrahiert wurde (Abb. 4.3B). Zudem konnte auch im Lungengewebe gesunder Schweine aus konventioneller Tierhaltung keine signifikante IL-17A-Sekretion der *A. fumigatus*-reaktiven T-Helferzellen detektiert werden (Abb. 4.3C).

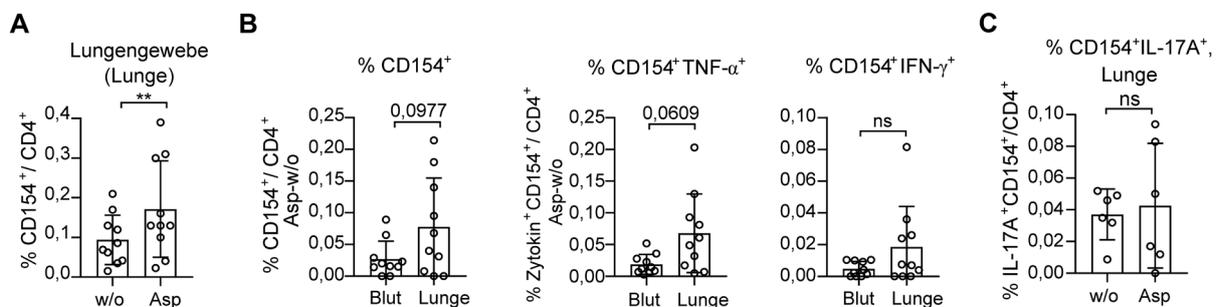


Abb. 4.3 *A. fumigatus*-reaktive CD4⁺ T-Zellen können lokal im Lungengewebe von gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung nachgewiesen werden

(A-B) Ex-vivo-Nachweis von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nach kurzzeitiger (6-stündiger) antigener Stimulation. (A) Frequenz der *A. fumigatus* reaktiven CD154⁺ T-Zellen von nicht stimulierten (w/o) oder stimulierten (Asp, 40 µg/ml) mononukleären Zellen aus Lungengewebe (Lunge) von n=10 Tieren als Mittelwert (Balken) ± SD; ratio paired t test. (B) Frequenzen von *A. fumigatus* reaktiven CD4⁺ T-Zellen in Blut und entsprechenden Lungengewebe (Lunge) von n=10 Tieren im Alter von 1,5 bis 2 Monaten und deren Zytokinexpression, zusammengefasst als Frequenz von TNF-α oder IFN-γ koproduzierenden CD154⁺ T-Zellen, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD. Der CD154⁺ Hintergrund der nicht stimulierten Kontrollen wurde abgezogen; ratio paired t-test, Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (C) Frequenz der IL-17A koproduzierenden *A. fumigatus* reaktiven CD154⁺ T-Zellen von nicht stimulierten (w/o) oder stimulierten (Asp, 40 µg/ml) mononukleären Zellen aus Lungengewebe (Lunge) von n=6 Tieren als Mittelwert (Balken) ± SD; paired t-test.

Zusammengefasst zeigen die dargestellten Ergebnisse, dass gesunde Schweine aus konventioneller Haltung einen signifikanten Anteil an CD4⁺ T-Zellen in peripherem Blut und Lungengewebe aufweisen, die spezifisch gegen *A. fumigatus* gerichtet sind. Vergleichend zu publizierten Studien an gesunden Menschen, die konstant *Aspergillus*-Konidien einatmen, konnte bei Schweinen aus konventioneller Haltung vergleichbare Daten im Hinblick auf Frequenz, Differenzierungsstatus und Phänotyp von CD154⁺ *A. fumigatus*-reaktiven T-Helferzellen erhoben werden. Die Analyse im Schwein als human-relevantes Großtiermodell ermöglicht darüber hinaus deren Nachweis und Charakterisierung im Lungengewebe.

4.2. Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen sowie gesamten T-Helferzellantwort nach experimenteller Konidienexposition

Untersuchungen in gesunden Menschen weisen auf eine deutliche Korrelation zwischen der Ausprägung einer pilzspezifischen T-Helferzellantwort und der Umweltexposition mit *A. fumigatus*-Sporen hin. Personen mit intensiver Pilzexposition im beruflichen oder privaten Umfeld zeigen dementsprechend im Blut deutlich höhere Frequenzen an *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen (Wurster et al. 2017). Um das Schwein als human-relevantes Modell zur Untersuchung der pilzspezifischen T-Zellantwort gegen aerogen übertragene *A. fumigatus*-Sporen zu etablieren, wurde eine experimentelle Exposition von Tieren aus konventioneller Haltung mittels Verneblung von *A. fumigatus*-Konidien in einer Aerosolkammer mit einer Grundfläche von 3,2 m² und einem Volumen von 7 m³ etabliert.

4.2.1. Aerolisierung von *A. fumigatus* Konidien mittels Ultraschallvernebler in einer Aerosolkammer

Während die Sporenkonzentration von *A. fumigatus* in der Luft von Schweineställen von 0 bis 100 KbE/m³ betragen kann (Sabino et al. 2012), wurde unter Zuhilfenahme einer Aerosolkammer die stressarme aerogene Exposition der Tiere mit einer konstanten Konzentration von 10⁶ KbE/m³ *Aspergillus*-Konidien über einen Zeitraum von 8 Stunden angestrebt.

4.2.1.1. Evaluierung und Validierung der angestrebten Konzentration an *A. fumigatus*-Konidien in der Aerosolkammer

Um eine definierte Konzentration von 10⁶ KbE/m³ *Aspergillus*-Konidien in der Luft der Aerosolkammer zu erreichen, wurden Konidien suspensionen unterschiedlicher

Konzentrationen getestet und die errechneten Werte in 3 unabhängigen Messungen validiert (Tab.4.1). Bei dem Einsatz einer Konidiensuspension der Konzentration $5 \times 10^7/\text{ml}$ konnte nach Aerosolisierung schließlich eine Konzentration an *A. fumigatus*-Konidien von 10^6 KbE/m³ in der Luft erzielt werden. Aufgrund der Luftprobensammlung auf 3 verschiedenen Höhen konnte die gleichmäßige Verteilung der Konidien innerhalb der Kammer gezeigt werden.

		Konzentration der Konidien (KbE/m ³) in der Luft		
Konidiensuspension	Position des Impingers	Messung 1	Messung 2	Messung 3
Suspension A [Konz.: $6 \times 10^6/\text{ml}$]	oben	$5,4 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$
	mittig	$4,7 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$
	unten	$6,5 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$
Suspension B [Konz.: $5 \times 10^7/\text{ml}$]	oben	$5,8 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$
	mittig	$4,5 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$
	unten	$4,8 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$

Tab. 4.1 Messung der Konzentration in der Luft befindlicher *A. fumigatus*-Konidien nach Einsatz von Konidiensuspensionen unterschiedlicher Konzentrationen

Um eine definierte Konzentration an *A. fumigatus*-Konidien in der Aerosolkammer zu erreichen, wurden Konidiensuspensionen unterschiedlicher Konzentrationen in 3 unabhängigen Messungen getestet. Dazu wurden – jeweils 10 min nach Beginn der Aerosolisierung – Luftproben an drei verschiedenen Positionen der Kammer (oben: 1,6 m; mittig: 0,8 m und unten: 0,3 m [Höhe]) 30 Minuten lang unter Verwendung eines mit 30 ml destilliertem, filtriertem und autoklaviertem Wasser gefüllten Glasimpingers gesammelt. Die Impinger wurden über Stahlrohre mit der Kammer und über Kunststoffschläuche mit einer Luftpumpe (Luftstrom: 12,5 l/min) verbunden. 100 µl des quantifizierten Restwassers im Impinger wurden auf Malzextraktagar ausplattiert und 42 h bei 37 °C inkubiert. Die Konzentrationen von *A. fumigatus*-Konidien (KbE/m³) in der Kammer wurden unter Einsatz der Anzahl der koloniebildenden Einheiten, der Menge des im Impingers verbleibenden Wassers, des Luftstromes und der Dauer der Luftprobenahme errechnet.

4.2.1.2. Überwachung der Konidienkonzentration in der Aerosolkammer während der experimentellen Exposition der Schweine

Um die Exposition der Schweine mit einer definierten Konzentration an *A. fumigatus*-Konidien sicherzustellen, wurde die Konzentration der in der Luft befindlichen Konidien auch während der experimentellen Exposition an zwei Positionen sowie zu zwei Zeitpunkten gemessen (Tab.

4.2). Anhand der Messungen während der experimentellen *Aspergillus*-Expositionen konnte gezeigt werden, dass auch bei Anwesenheit der Schweine in der Aerosolkammer durch Einsatz der validierten Konidiensuspension eine Konzentration von 10^6 KbE/m³ an *A. fumigatus*-Konidien in der Luft erzielt wurde.

Konzentration der Konidien (KbE/m ³) in der Luft			
	Position des Impingers	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
Exposition A	oben	$6,38 \times 10^6$	$8,09 \times 10^6$
	mittig	$6,54 \times 10^6$	$8,15 \times 10^6$
Exposition B	oben	$2,07 \times 10^6$	$2,48 \times 10^6$
	mittig	$2,15 \times 10^6$	$4,36 \times 10^6$
Exposition C	oben	$5,11 \times 10^6$	$3,55 \times 10^6$
	mittig	$3,86 \times 10^6$	$5,01 \times 10^6$

Tab. 4.2 Messung der Konzentration in der Luft befindlicher *A. fumigatus*-Konidien während der experimentellen Exposition der Schweine

Um die Konzentration von *A. fumigatus*-Konidien in der Luft während der Expositionsexperimente zu kontrollieren, wurden Luftproben an zwei verschiedenen Positionen der Kammer (oben: 1,6 m und mittig: 0,8 m [Höhe]) über 30 min und zu zwei Zeitpunkten (1: 0,5 h und 2: 6 h nach Beginn der Aerosolisierung) unter Verwendung eines mit 30 ml destilliertem, filtriertem und autoklaviertem Wasser gefüllten Glasimpingers gesammelt. Die Impinger wurden über Stahlrohre mit der Kammer und über Kunststoffschläuche mit einer Luftpumpe (Luftstrom: 12,5 l/min) verbunden. 100 µl des quantifizierten Restwassers im Impinger wurden auf Malzextraktagar ausplattiert und 42 h bei 37 °C inkubiert. Die Konzentrationen der *A. fumigatus*-Konidien (KbE/m³) in der Kammer bei Exposition A, B und C wurden unter Einsatz des Mittelwertes der Anzahl der ausgezählten koloniebildenden Einheiten, des Verdünnungsfaktors, der Menge des im Impinger verbleibenden Wassers, des Luftstromes sowie der Dauer der Luftprobenahme errechnet.

4.2.1.3. Nachweis der *A. fumigatus*-Konidien in der porzinen Lunge nach experimenteller Exposition

Aufgrund ihrer geringen Größe von 2-3 µm können luftgetragene Konidien von *A. fumigatus* tief in die Atemwege sowohl des Menschen als auch anderer Säugetiere eindringen und die Alveolen der Lunge erreichen (Van De Veerdonk et al. 2017a). Um sicherzustellen, dass aerosolisierte *Aspergillus*-Konidien während der experimentellen Exposition der Schweine in der Aerosolkammer in die tiefen Atemwege der Tiere gelangen, wurden unmittelbar nach 8-

stündiger Exposition mit einer Konidien-Konzentration von 10^6 KbE/m³ sowohl mikrobiologische als auch histologische Daten der Lunge eines Tieres erhoben. Mittels Rekultivierung von bronchoalveolärer Spülflüssigkeit (bronchoalveoläre Lavage, BAL) konnte eine Sporenlast von $9,57 \times 10^4$ KbE in der Lunge des Tieres ermittelt werden. Unter Einsatz der *A. fumigatus*-spezifischen PCR gelang zudem der qualitative Nachweis des Pilzes in der BAL des exponierten Tieres (mittlerer Zyklusschwellenwert, C_T mean=33,05). Auch mittels immunhistologischer Färbung von Lungengewebsproben gelang der *A. fumigatus*-spezifische Nachweis einer deutlichen Sporenlast in der Lunge des experimentell exponierten Tieres (Abb. 4.4) in Abgrenzung zu Negativkontrollen.

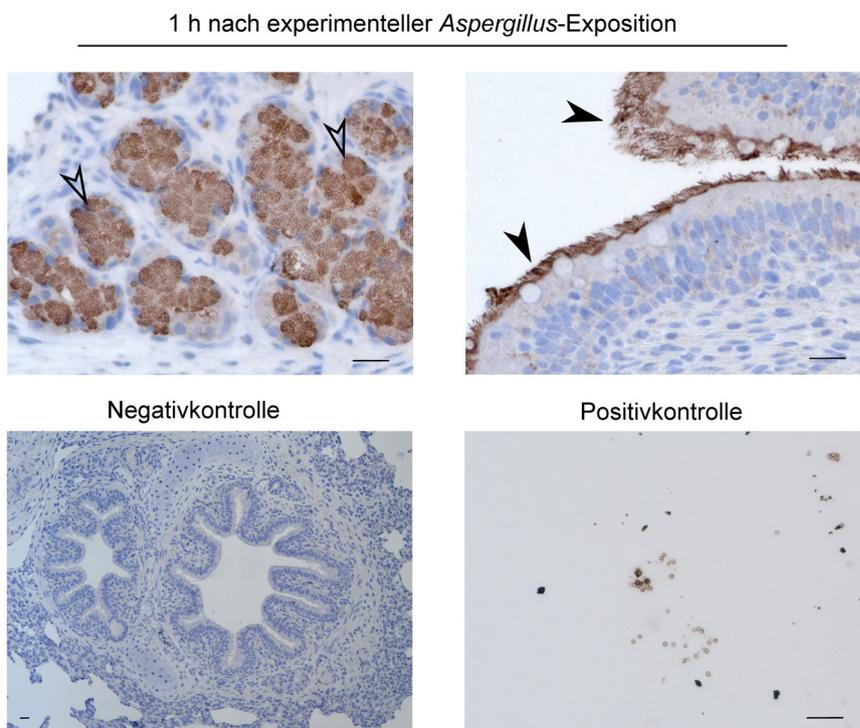


Abb. 4.4 Immunhistologischer Nachweis von *A. fumigatus*-Konidien in der Lunge eines Schweines unmittelbar nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition

Histologie des Lungengewebes exemplarisch des linken Lungenlappens eines experimentell *A. fumigatus*-Konidien-exponierten Schweines. Die Gewebe wurden eine Stunde nach Exposition gesammelt, fixiert, in Paraffin eingebettet und die Gewebsschnitte wurden mit einem Anti-*Aspergillus*-Antikörper immunhistologisch gefärbt. Dargestellt sind positive *A. fumigatus*-Signale (oben) in submukösen Drüsen (offene Pfeile) und im Bürstensaum des respiratorischen Epithels (schwarz gefüllte Pfeile) sowie eine Negativ- und Positivkontrolle (unten). Maßstab = 20 μ m

4.2.2. Studiendesign der experimentellen *Aspergillus*-Exposition gesunder Schweine aus konventioneller Tierhaltung

Nach entsprechender Validierung erfolgte die experimentelle Exposition der Tiere gegenüber aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien mit einer konstanten Konzentration von $10^6/\text{m}^3$ KbE über einen Zeitraum von 8 Stunden in der beschriebenen Aerosolkammer. Vor der Exposition (Tag 0) sowie zu mehreren Zeitpunkten nach der Exposition (Tage 2, 4, 6, 10, 13 und 18) erfolgte eine Blutentnahme, bevor die Tiere an zwei Zeitpunkten, Tag 10 oder 18, seziiert und Gewebeproben aus Lunge und Lungenlymphknoten entnommen wurden. Es wurden zwei Endpunkte ausgewählt, um die mögliche Einwanderung von *A. fumigatus*-spezifischen CD4^+ T-Zellen in die Atemwege (Tag 10) sowie deren Akkumulation oder auch Rezirkulation (Tag 18) zu analysieren (Abb. 4.5).

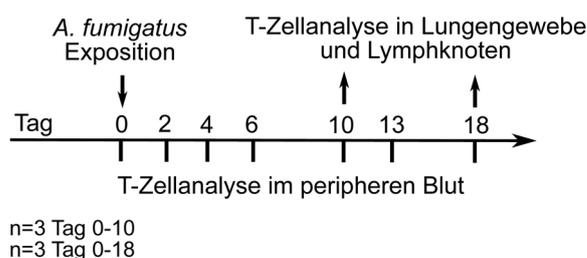


Abb. 4.5 Schema des Versuchsablaufes der experimentellen *Aspergillus*-Exposition gesunder Schweine aus konventioneller Tierhaltung in einer Aerosolkammer

Der Versuchsaufbau gibt Beobachtungszeiträume (10-18 Tage), Tierzahlen ($n=3$ Tag 0-10; $n=3$ Tag 0-18) und Zeitpunkte für die Blut- (Tag 0, 2, 4, 6, 10, 13, und 18) sowie Lungengewebs- und Lymphknoten-Probennahme (Tag 10 und 18) an.

4.2.3. Ergebnisse der *A. fumigatus*-spezifischen Diagnostik

Obwohl die Schweine hohen Dosen von 10^6 KbE/ m^3 *A. fumigatus*-Konidien in der Luft über 8 h ausgesetzt waren, entwickelten die Tiere keine klinischen Anzeichen einer invasiven Aspergillose. Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR), die auf den internen transkribierten Spacer 1 (ITS1) -5.8S-rRNA-Genbereich abzielt, wurde angewendet, um den Pilz in bronchoalveolären Spülflüssigkeit (bronchoalveoläre Lavage, BAL) nachzuweisen. Positive BAL-PCR-Ergebnisse (1 von 6 immunkompetenten Schweine) wurden unter Einsatz von Serumproben verifiziert (Tab. 4.3). Die Ergebnisse der PCR-Analysen in BAL und Serum sowie die mikroskopische Untersuchung von Lungengewebschnitten auf Hyphenwachstum unter Einsatz eines polyklonalen Antikörpers

für die immunhistochemischen Nachweis von *Aspergillus* (Tag 10) oder mittels PAS-Reaktion (Abk. für engl. Periodic acid-Schiff reaction) zeigten jedoch keine Anzeichen eines invasiven Pilzwachstums (Tab. 4.3, Abb. 4.6). Auch gesunde, immunkompetente Menschen ohne wesentliche Vorerkrankungen sind in der Regel gegenüber pulmonalen Infektionen mit *A. fumigatus* resistent.

Versuchstag	Tier	PCR BAL	PCR Serum
10	1	pos (39,4)	neg
	2	neg	NM
	3	neg	NM
18	4	neg	NM
	5	neg	NM
	6	neg	NM

Tab. 4.3 Die Ergebnisse der *A. fumigatus*-spezifischen PCR in Lungenspülproben und Serum ergaben kein invasives Pilzwachstum

Bronchoalveoläre Lavage (BAL) -Proben von immunkompetenten Schweinen an den Tagen 10 und 18 und nach experimenteller Exposition mit aerosolisierten *Aspergillus*-Konidien wurden mittels *A. fumigatus*-spezifischer real-time PCR analysiert. Bei positivem PCR-Ergebnis der BAL wurden die Serumproben aller Probenahmezeitpunkte (Tag 0, 2, 4, 6, 10, 13, 18) analysiert. Die mittleren Zyklusschwellenwerte sind in Klammern angegeben. Pos, positiv; neg, negativ; NM, not measured = nicht gemessen.

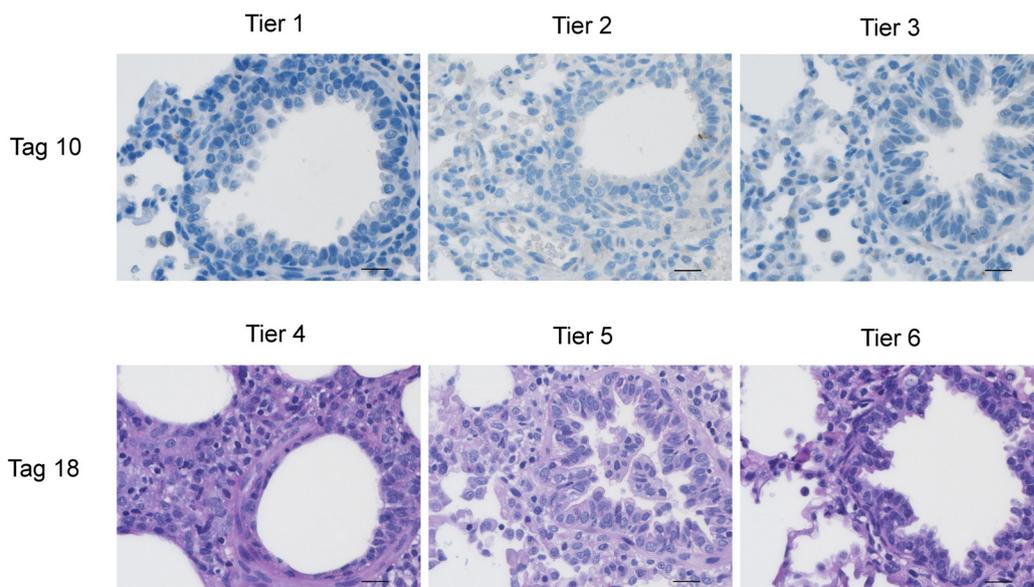


Abb. 4.6 Mittels histologischer Untersuchung konnte kein Hyphenwachstum im Lungengewebe der *Aspergillus*-exponierten Schweine nachgewiesen werden

Histologie des Lungengewebes exemplarisch des cranialen linken Lungenlappens (Lobus cranialis sinister, Pars caudalis) der experimentell *Aspergillus*-exponierten Schweine. Die Gewebe wurden gesammelt, fixiert, in Paraffin eingebettet und die Gewebeschnitte wurden mit einem Anti-*Aspergillus*-Antikörper für die Immunhistochemie (Tag 10) oder mittels PAS-Reaktion (Abk. für engl. Periodic acid-Schiff reaction) (Tag 18) gefärbt. Maßstab = 20 μm .

4.2.4. Detektion *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen in Blut, Lungengewebe und Lungenlymphknoten nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition

Die Ex-vivo-Analyse der Frequenzen porciner *A. fumigatus*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Blut über die Zeit des Versuches ergab einen deutlichen Trend eines frühen Peaks der gesamten pilzreaktiven CD154⁺ T-Zellen an Tag 4 nach der experimentellen Exposition in der Aerosolkammer im Vergleich zu den Daten an Tag 0 nach vorangegangener natürlicher Umgebungsexposition (Abb. 4.7B) sowie einen signifikanten Anstieg der TNF- α und IFN- γ -koexprimierenden pilzspezifischen T-Helferzellen. (Abb 4.7C). Zudem stiegen an Tag 18 nach *Aspergillus*-Exposition die Frequenzen im Blut der Zytokin-produzierenden *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen signifikant über die Werte von Tag 0 an (Abb 4.7C). Färbungen des Oberflächenmarkers CD8 α zeigten eine zunehmende CD8 α -Expression auf pilzreaktiven CD154⁺ T-Zellen nach experimenteller Exposition, aber auch einen äquivalenten Trend in der CD154⁻ Population (Abb 4.7D). Daher konnte nicht direkt nachgewiesen werden, dass naive *A. fumigatus*-spezifische CD4⁺ T-Zellen in Effektor-Th-Zellen übergehen infolge der experimentellen *Aspergillus*-Exposition.

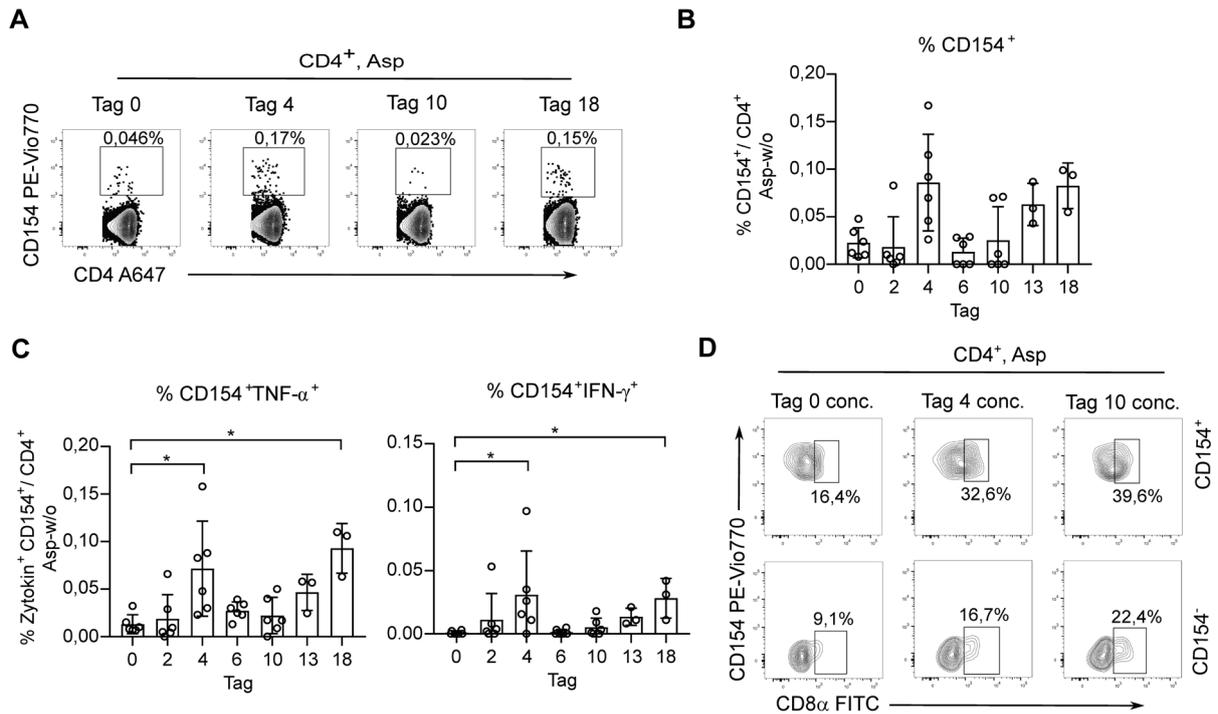


Abb. 4.7 Anstieg der Frequenz *A. fumigatus*-reaktiver CD4⁺ T-Zellen im Blut nach experimenteller Exposition gegenüber *Aspergillus*-Konidien

Eine beispielhafte kinetische Analyse (Tag 0, 4, 10 und 18) von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen im Blut, die aufgrund ihrer CD154-Expression nach einer kurzzeitigen (6-stündigen) Stimulation mit *A. fumigatus*-Lysat identifiziert wurden, ist in **A** dargestellt und für n=3-6 Tiere und alle Zeitpunkte in **B** zusammengefasst, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD, Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. **(C)** Frequenz von Zytokin-produzierenden *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen, die TNF-α (links) oder IFN-γ (rechts) exprimieren, angegeben als Mittelwert (Balken) ± SD. Der CD154⁺ Hintergrund der nicht stimulierten Kontrolle wurde abgezogen; Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. **(D)** Konkatenierte Konturdiagramme (von n=6 Tieren), die den prozentualen Anteil von CD154⁺ CD8α⁺ und CD154-CD8α⁺ innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation nach kurzzeitiger Stimulation mit *A. fumigatus*-Lysat vor (Tag 0) und nach (Tag 4 und 11) experimenteller Exposition gegenüber *Aspergillus*-Konidien darstellen.

Im Gegensatz zu humanen Studien liefern Untersuchungen am porzinen Großtiermodell detaillierte Informationen über die lokale Immunantwort betroffener Organe. Daher lag ein Fokus dieser Arbeit auf der vergleichenden Analyse pilzreaktiver T-Zellen in Blut, Lungengewebe und Lungenlymphknoten im Hinblick auf die Daten der zwei betrachteten Zeitpunkte an den Tagen 10 und 18. Um der Organgröße der Schweinelunge gerecht zu werden und lokale Unterschiede der Immunantwort zu berücksichtigen, wurden

Gewebsproben aus sieben verschiedenen anatomischen Lungenregionen entnommen, die Gewebeprobe anschließend gepoolt und die *A. fumigatus*-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort erfasst. Parallel dazu wurden fünf verschiedene Lungenlymphknoten entnommen und ebenfalls als Pool bearbeitet. Wie in Abb. 4.8A exemplarisch nach Restimulation mit *A. fumigatus*-Antigen dargestellt und in Abb. 4.8B für die Tage 10 und 18 zusammengefasst, zeigte sich eine signifikante Immunantwort von CD154⁺CD4⁺ T-Zellen nach Antigen-spezifischer Restimulation bei aus Lungengewebe isolierten Lymphozyten sowie bei denen aus Blut und Lungenlymphknoten nach experimenteller Exposition im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (w/o). Nach Abzug des CD154⁺ Hintergrundes der nicht stimulierten Kontrollen betrug die durchschnittliche Frequenz der *A. fumigatus*-reaktiven T-Helferzellen an Tag 10 und 18 nach Exposition in der Lunge 0,1968 % (Standardabweichung: $\pm 0,2081$ %), während bei natürlich exponierten Tieren aus konventioneller Tierhaltung zuvor eine durchschnittliche Frequenz von nur $0,0776 \pm 0,07735$ % (siehe Abb. 4.3B) ermittelt wurde. Die vergleichende Analyse der *A. fumigatus*-reaktiven T-Helferzellen im peripheren Blutkreislauf sowie lokal im Gewebe an Tag 10 und 18 nach der Exposition ergab zudem einen Trend zu höheren Frequenzen von pilzspezifischen T-Zellen im Lungengewebe im Vergleich zu Blut und Lungenlymphknoten (Abb. 4.8C). Interessanterweise war eine derart starke antimykotische Reaktivität von CD4⁺CD154⁺ T-Zellen an Tag 18 besonders ausgeprägt, was auf eine ortsgerichtete Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen in Lungengewebe für mindestens 18 Tage nach der Exposition mit aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien hinweist. Bei Betrachtung der Th1-Zytokinproduktion war die Frequenz von IFN- γ koexprimierenden *A. fumigatus*-reaktiven T-Zellen im Lungengewebe signifikant höher als in Lungenlymphknoten nach Abzug des CD154⁺ Hintergrundes (Abb. 4.8C). Die insgesamt sehr geringen Frequenzen der spezifisch *A. fumigatus*-erkennenden Zellen innerhalb des Pools von CD4⁺ T-Zellen sowie die unterschiedlichen organspezifischen Hintergrundwerte schränken jedoch den direkten Vergleich der Organdaten ein.

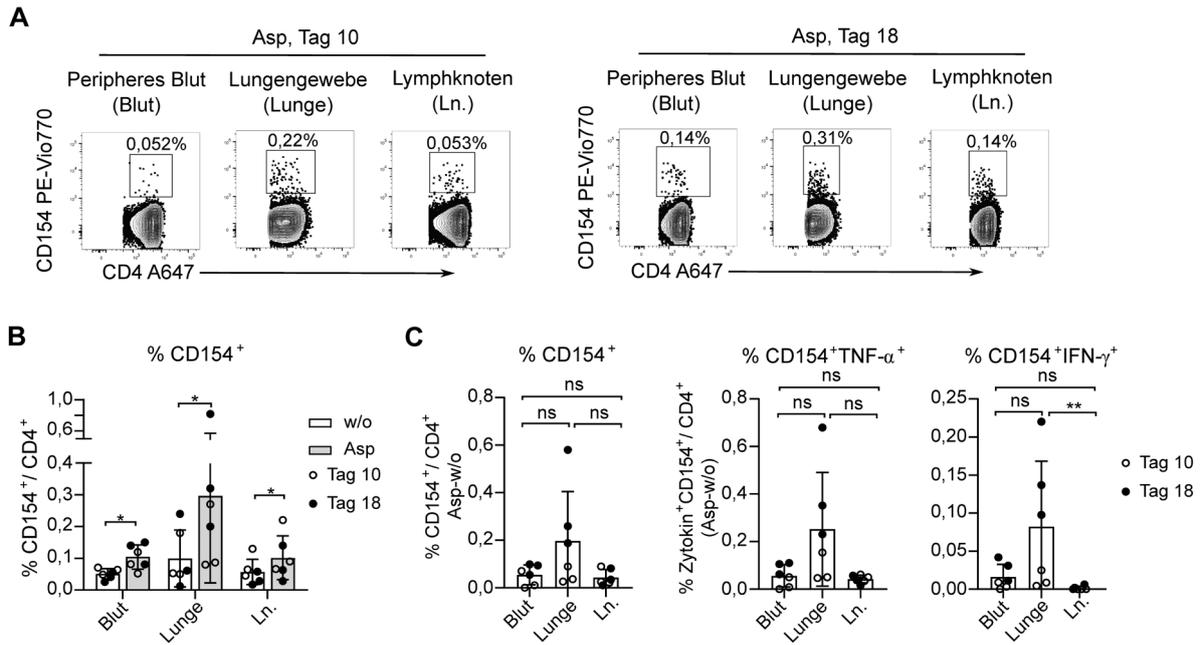


Abb. 4.8 Ex-vivo-Detektion der lokalen pilzspezifischen Th-Zellantwort deutet auf eine ausgeprägte *A. fumigatus*-spezifische Reaktivität in der Lunge hin

(A) Analyse der Frequenzen der *A. fumigatus*-reaktiven CD154⁺ T-Zellen im peripheren Blut (Blut), Lungengewebe (Lunge) und Lungenlymphknoten (Ln.), zusammengefasst in (B) für nicht stimulierte (w/o) und stimulierte (Asp, 40 µg/ml) PBMCs oder entsprechende mononukleäre Zellen aus dem Lungengewebe oder Lungenlymphknoten, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD an den finalen Tagen 10 (offene Kreise, n=3) und 18 (schwarz gefüllte Kreise, n=3); two-tailed paired t test. (C) Frequenzen der *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut (Blut), Lungengewebe (Lunge) und Lungenlymphknoten (Ln.) sowie deren Zytokin-Koproduktion wurden als Mittelwert (Balken) ± SD an den finalen Tagen 10 (offene Kreise, n=3) und 18 (schwarz gefüllte Kreise, n=3) angegeben. Der CD154⁺ Hintergrund der nicht stimulierten Kontrollen wurde abgezogen; RM one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test, Friedman test with Dunn's multiple comparisons test

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die experimentelle Exposition von immunkompetenten Schweinen aus konventioneller Aufzucht mit hohen Konzentrationen von aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien gut toleriert wird ohne ein Krankheitsgeschehen auszubilden. Eine definierte Pilzexposition führte zu einer lokalen Antigen-spezifischen T-Zellantwort gegen *A. fumigatus* im Lungengewebe sowie und zu einem frühen Peak der zirkulierenden *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen im Blut der Tiere bereits 4 Tage nach *Aspergillus*-Exposition.

4.2.5. Magnetische Anreicherung und Charakterisierung *A. fumigatus*-spezifischer Th-Zellen in Blut, Lungengewebe und Lungenlymphknoten

Die geringe Gesamtanzahl *A. fumigatus*-reaktiver T-Helferzellen im Blut limitiert die eingehende Analyse pilzspezifischer T-Zellen, welche nach Restimulation mit *Aspergillus*-Lysat identifiziert werden konnten. Um diese Einschränkung im Schweinmodell zu überwinden, wurde eine für porcine Lymphozyten modifizierte Methode der Antigen-reaktiven T-Zell-Anreicherung (Antigen-reactive T cell enrichment, ARTE), welche ursprünglich auf der magnetischen Isolierung von humanen CD154-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen basiert, angewandt. ARTE wird routinemäßig angewendet, um seltene Populationen menschlicher Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen zu analysieren (Bacher et al. 2013). Aufgrund der transienten Expression von CD154 an der Zelloberfläche und der fehlenden Verfügbarkeit eines schweinespezifischen oder kreuzreaktiven CD40-blockierenden Antikörpers zur Verhinderung der CD154-Internalisierung wurde eine Kombination aus dem sog. „CD154 surface trapping“ (Cohen et al. 2005) und einer chemischen Stabilisierung mittels Monensin angewandt (Chattopadhyay et al. 2006). Dabei werden isolierte PBMCs mit *A. fumigatus*-Lysat in Gegenwart eines CD154-PE-Antikörpers stimuliert, um die Komplexbildung des de-novo-synthetisierten CD154 an der porcinen Zelloberfläche und fluoreszenzmarkierten CD154-Antikörpers zu ermöglichen. Zudem wird Monensin nach 2-stündiger Stimulation aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf Natriumprotonen-Austauscher zugesetzt, um saure intrazelluläre Kompartimente zu neutralisieren und dadurch die CD154-Antikörper-Komplexe auf der Zelloberfläche zu stabilisieren (Chattopadhyay et al. 2006). Die Zellen werden mit magnetischen Anti-Fluorochrom-Mikrobeads markiert und weitere 2 Stunden in Gegenwart von Monensin und Brefeldin A inkubiert, um die intrazellulären Zytokinsignale zu verstärken. Das „CD154 surface trapping“ ermöglicht die magnetische Anreicherung von CD154-exprimierenden porcinen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen und zudem die detaillierte Analyse der Anzahl der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen sowie der Zytokinexpression, wie in Abbildung 4.9 für ein experimentell exponiertes und an Tag 18 seziiertes Schwein dargestellt.

Anstieg bis zum finalen Zeitpunkt des Experimentes (Tag 18). Die Gesamtzahl der CD154⁺ Zellen (Abb. 4.10C) sowie der IFN- γ produzierenden CD154⁺CD4⁺ T-Zellen stieg im Vergleich zum Ausgangswert an Tag 0 signifikant an (Abb. 4.10B). Wie bereits anhand der Frequenz nicht angereicherter pilzspezifischer T-Helferzellen dargestellt, bestätigte die magnetische Anreicherung die Immunantwort *A. fumigatus*-reaktiver CD4⁺ T-Zellen kurz nach der experimentellen Exposition und interessanterweise auch zu einem späteren Zeitpunkt.

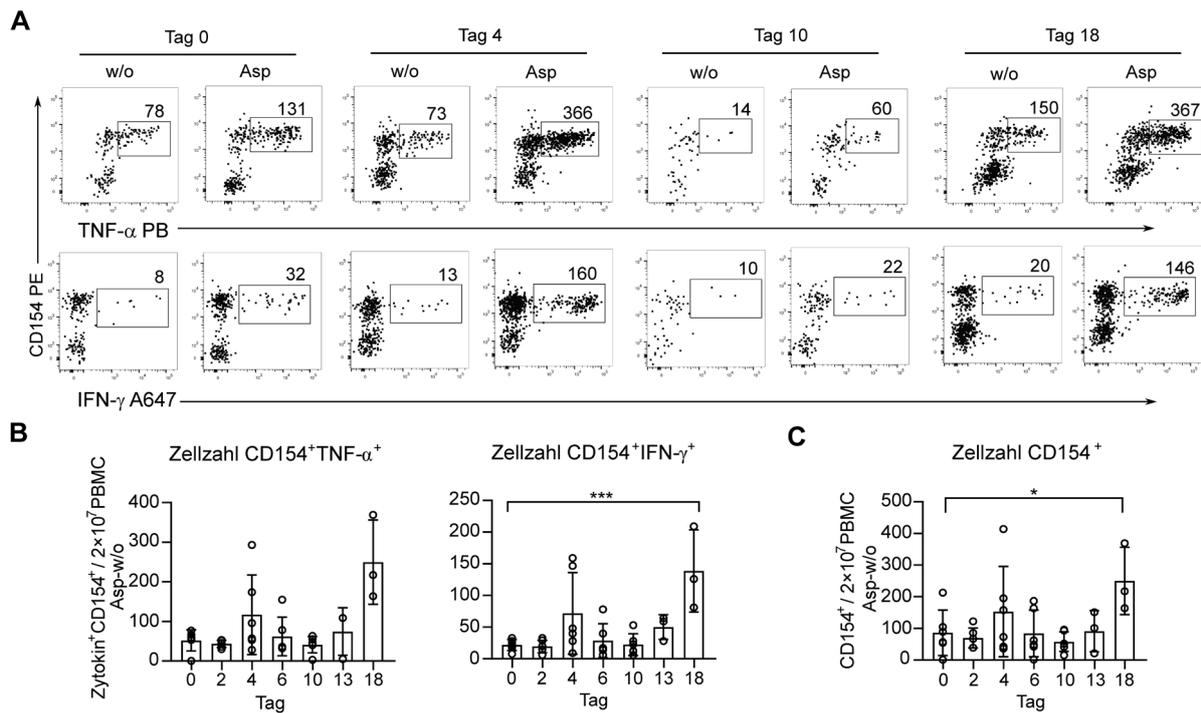


Abb. 4.10 Die magnetische Anreicherung bestätigt den Anstieg pilzspezifischer T-Helferzellen im Blut gesunder Schweine nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition

(A) Beispielhafte Kinetik von magnetisch angereicherten *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die TNF- α (obere Zeile) oder IFN- γ (untere Zeile) exprimieren sowie nicht stimulierte Kontrollen an den Tagen 0, 4, 10 und 18 von einem repräsentativen Schwein. Angegeben ist die Zellzahl/2x10⁷ PBMCs. Die Daten sind in (B) für Zytokin-koexprimierende CD154⁺ Zellen (TNF- α , links und IFN- γ , rechts) und in (C) für die gesamten CD154⁺ Zellen zusammengefasst, dargestellt als Mittelwert \pm SD von n=3-6 Schweinen; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test

Um zu überprüfen, ob das Th1-Zytokinprofil von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen in der Peripherie tatsächlich die lokale Antwort in der Lunge widerspiegelt, wurde die Menge pilzreaktiver und Zytokin-koexprimierender CD4⁺ T-Zellen aus Lungengewebsproben sowie

Lungenlymphknoten mit Ergebnissen aus dem Blut an den Tagen 10 und 18 nach experimenteller Exposition verglichen (Abb 4.11).

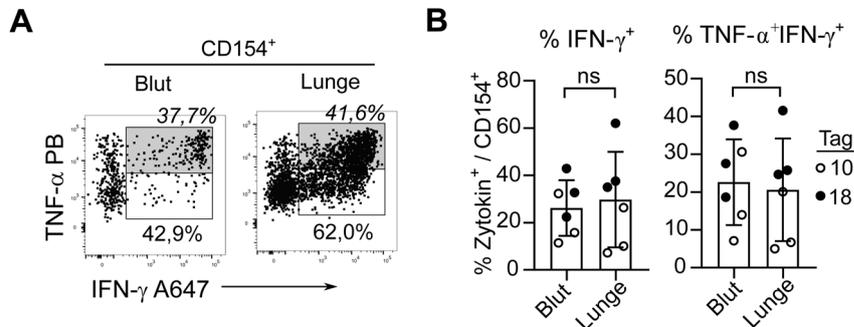


Abb. 4.11 *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen peripher im Blut sowie lokal im Lungengewebe weisen einen kohärenten Phänotyp auf

(A) Exemplarische Dot Plot-Diagramme zeigen die Frequenzen von IFN- γ produzierenden Zellen und IFN- γ /TNF- α koproduzierenden Zellen (grauer Hintergrund, Frequenz in Kursivschrift) in der Lunge im Vergleich zu Blut an Tag 18, zusammengefasst für n=6 Schweine (Tag 10 n=3, offene Kreise und Tag 18 n=3, schwarz gefüllte Kreise) in (B), dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD, two-tailed paired t-test.

Während die magnetische Anreicherung beim Vergleich von Blut- und Gewebsdaten keinen signifikanten Unterschied in der anteiligen Frequenz von CD154⁺T-Zellen ergab, welche IFN- γ oder IFN- γ und TNF- α produzieren (Abb. 4.11A und B), konnte eine signifikant höhere Anzahl an *A. fumigatus*-reaktive T-Zellen im Lungengewebe exponierter Tiere im Vergleich zu Blut und Lungenlymphknoten nachgewiesen werden (Abb. 4.12A, B und C). Bei dem Vergleich von *A. fumigatus*-reaktiven T-Zellen aus dem Lungengewebe von experimentell exponierten (exp. expon.) mit natürlich exponierten, gesunden und altersangepassten Schweinen (nat. expon.), die in konventioneller Haltung natürlicherweise *Aspergillus*-Sporen ausgesetzt sind, konnte anhand der magnetischen Anreicherung gezeigt werden, dass sich *A. fumigatus*-reaktive T-Zellen spezifisch im Lungengewebe nach experimenteller Exposition mit hohen Dosen von *Aspergillus*-Konidien anreichern (Abb. 4.12D). Bei dem Vergleich der Anzahl pilzreaktiver Th-Zellen in Blut und Lungengewebe zwischen den Tagen 10 und 18 konnte zwar ein zunehmender Trend dargestellt werden, jedoch kein signifikanter Unterschied.

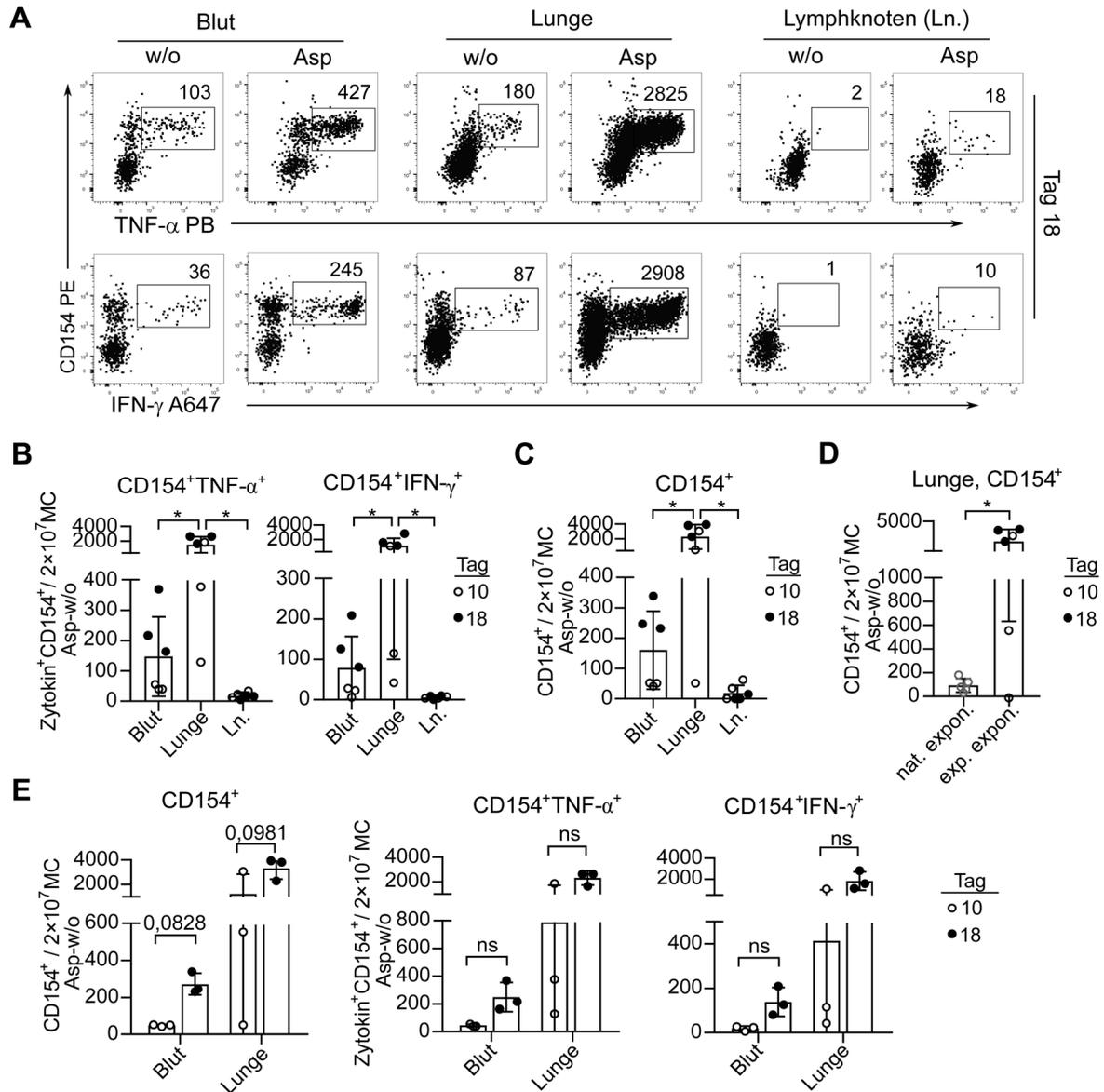


Abb. 4.12 Anreicherung pilzspezifischer T-Helferzellen nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition im Lungengewebe der Schweine

(A) Beispielhafte Dot Plot-Diagramme von angereicherten *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, die TNF- α (obere Zeile) oder IFN- γ (untere Zeile) exprimieren sowie nicht stimulierte Kontrollen von Zellen, die aus Blut, Lungengewebe (Lunge) und Lungenlymphknoten (Ln.) isoliert wurden. (B) Vergleich von pilzreaktiven, angereicherten CD154⁺ T-Zellzahlen, die TNF- α (links) oder IFN- γ (rechts) in Blut, Lungengewebe (Lunge) und Lungenlymphknoten (Ln.) koexprimieren an den Tagen 10 (n=3, offene Kreise) und 18 (n=3, schwarz gefüllte Kreise) nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition. (C) Vergleich der Anzahl pilzreaktiver, angereicherter CD154⁺ T-Zellen in Blut, Lungengewebe (Lunge) und Lungenlymphknoten (Ln.) an den Tagen 10 (n=3, offene Kreise) und 18 (n=3, schwarze gefüllte Kreise) nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition. In (B) und (C) dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. (D) Vergleich der *A. fumigatus*-

reaktiven, angereicherten CD154⁺ T-Zellzahlen in Lungengewebe (Lunge) von natürlich exponierten Schweinen (nat. expon.) und experimentell exponierten Tieren (exp. expon.) an den Tagen 10 (n=3, offene Kreise) und 18 (n=3, schwarz ausgefüllte Kreise) nach *Aspergillus*-Exposition, angegeben als Mittelwert (Balken) ± SD; two-tailed paired t test. (E) Vergleich der Anzahl pilzreaktiver, angereicherter CD154⁺ T-Zellen (links), CD154⁺TNF-α⁺ T-Zellen (Mitte) und CD154⁺IFN-γ⁺ T-Zellen (rechts) in Blut und Lungengewebe (Lunge) zwischen den Tagen 10 (n=3, offene Kreise) und 18 (n=3, schwarze gefüllte Kreise) nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; Wilcoxon matched-pairs signed ranks test und Paired t test.

Zusammenfassend konnte durch die Anwendung einer Methode für das Schwein zur magnetischen, Antigen-reaktiven T-Zell-Anreicherung gezeigt werden, dass *A. fumigatus*-reaktive T-Zellen nach aerogener Exposition mit Konidien spezifisch im Lungengewebe akkumulieren. Zudem zeigten sowohl die pulmonalen pilzreaktiven T-Helferzellen als auch solche im peripheren Blutkreislauf einen durch TNF-α bzw. IFN-γ geprägten Th1-Phänotyp.

4.2.6. Antigen-unspezifische Analyse der T-Helferzellantwort nach experimenteller Exposition mit *Aspergillus*-Konidien

Neben der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellanalyse via Aktivierungsmarker CD154 wurde auch die T-Helferzellantwort unabhängig von der Antigen-Spezifität nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition erfasst. Studien an humanen und murinen T-Zellen haben gezeigt, dass die Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA3 und FoxP3 Schlüsselakteure bei der Entwicklung und funktionellen Differenzierung von Th1-, Th2 und Treg-Zellen sind (Oestreich und Weinmann 2012; Lazarevic et al. 2013; Wan 2014; Lu et al. 2017). Auch bei T-Zellanalysen im Schwein konnten funktionelle Subpopulationen von porzinen T-Helferzellen schließlich auf der Basis der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA3 und FoxP3 mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden (Kaser et al. 2008a; Ebner et al. 2014; Rodriguez-Gomez et al. 2016). Daher erfolgte zunächst vor (Tag 0) sowie nach *Aspergillus*-Exposition (Tag 2, 4, 6, 10, 13 und 18) die durchflusszytometrische Analyse der Expression der genannten Transkriptionsfaktoren in CD4⁺ T-Zellen der Schweine (Abb. 4.13A). Dabei konnte an Tag 4 ein signifikanter Anstieg der T-bet-Expression gezeigt werden. Der Anteil T-bet⁺ T-Zellen von durchschnittlich 30,18 % aller CD4⁺ T-Zellen an Tag 4 übersteigt dabei die Werte der CD154⁺ pilzreaktiven Th-Zellen (siehe Abb. 4.7, durchschnittlich 0,086 %) deutlich. Daraus folgend kann auf eine mögliche Th1-Differenzierung nicht *A. fumigatus*-spezifischer porziner T-Zellen nach *Aspergillus*-Exposition geschlossen werden. Zudem wurde die FoxP3-Expression und folglich der Anteil

regulatorischer T-Zellen aller $CD4^+$ T-Zellen der Schweine an Tag 4 signifikant reduziert (Kaser et al. 2008b). Die Analyse der Expression von Ki-67 der $CD4^+$ T-Zellen verdeutlichte einen Anstieg der Proliferationsraten der porzinen T-Helferzellen an Tag 4 und 6 nach *Aspergillus*-Exposition (Abb. 4.13B). Zahlreiche Studien an Viruserkrankungen und bakteriellen Infektionen im Schwein führten zu der gegenwärtigen Annahme, dass der Oberflächenmarker $CD8\alpha$ auf aktivierten sowie Gedächtnis-T-Helferzellen exprimiert ist (Gerner et al. 2015). 4 Tage nach experimenteller Exposition der Schweine mit aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien stieg auch der Anteil der $CD4/CD8\alpha$ doppelt-positiven T-Zellen signifikant an (Abb. 4.13C).

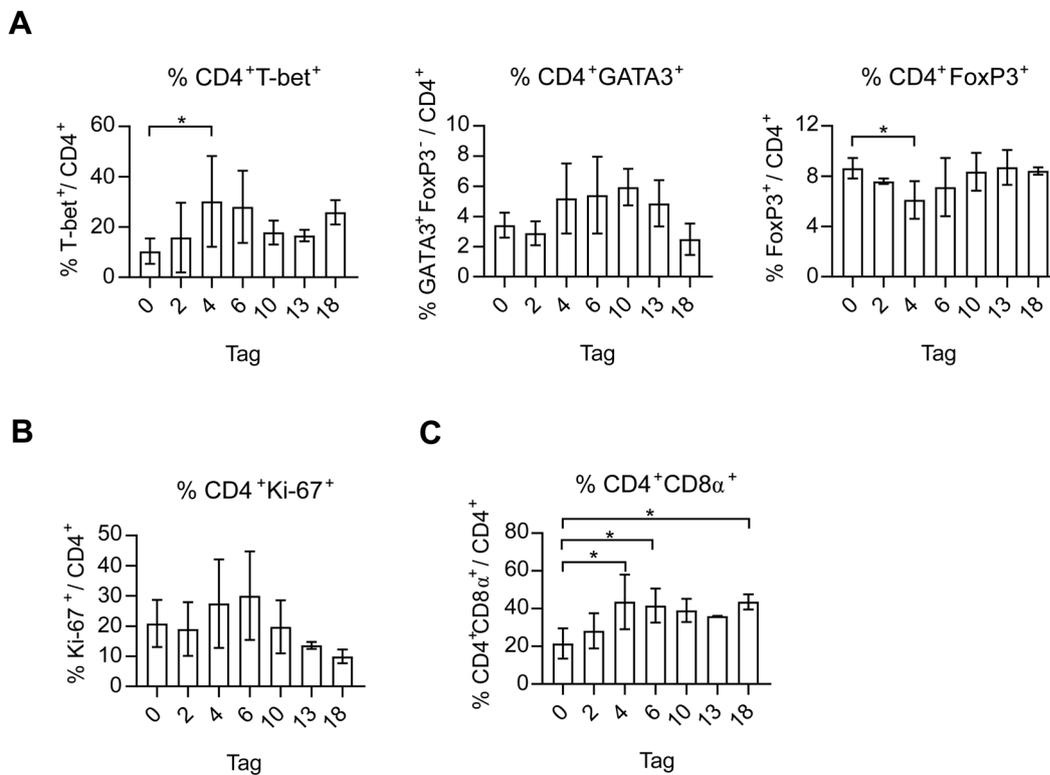


Abb. 4.13 CD154-unabhängige Analyse der Th-Zellreaktion nach *Aspergillus*-Exposition

(A) Analyse der Frequenzen der T-bet (links), GATA3 (Mitte) sowie FoxP3 (rechts) exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut vor (Tag 0) sowie nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition zusammengefasst für n=6 Schweine (Tag 2 bis 10) sowie n=3 Schweine an Tag 13 und 18, dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD, one-way-ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test, Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test. (B) Frequenzen der Ki-67⁺ Zellen aller $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut vor (Tag 0) sowie nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition zusammengefasst für n=6 Schweine (Tag 2 bis 10) sowie n=3 Schweine an Tag 13 und 18, dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD. (C) Anteil der $CD4/CD8\alpha$ doppelt-positiven T-Zellen aller $CD4^+$ T-Helferzellen im peripheren Blut vor (Tag 0) sowie nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition zusammengefasst für n=6

Schweine (Tag 2 bis 10) sowie n=3 Schweine an Tag 13 und 18, dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD, Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test.

Folglich konnte neben der Detektion der *A. fumigatus*-spezifischen CD154⁺ Zellen eine Th1-Immunantwort überwiegend nicht *A. fumigatus*-spezifischer Th-Zellen sowie kurzzeitige Reduktion der regulatorischen T-Zellen nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition im Blut der Schweine erfasst werden.

4.3. Vergleichende Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen sowie gesamten T-Helferzellanwort von immunkompromittierten und immunkompetenten Schweinen nach experimenteller Exposition

Studien zufolge atmet jeder Mensch täglich mindestens mehrere Hundert *A. fumigatus*-Konidien ein. Deren Inhalation hat jedoch selten negative Auswirkungen auf immunkompetente Menschen, da die Konidien relativ effizient durch angeborene Immunmechanismen eliminiert werden. Immungeschwächte Menschen jedoch oder Patienten mit vorbestehenden Lungenerkrankungen leiden nicht selten unter invasiver Aspergillose (IA) oder an *Aspergillus*-assoziierten hyperinflammatorischen Erkrankungen wie etwa exogener allergischer Alveolitis, allergischer Sinusitis, Asthma oder allergischer bronchopulmonaler Aspergillose (ABPA) (Latge 1999). Der folgende Teil der Arbeit soll sich daher mit der Frage beschäftigen, ob und inwieweit sich eine immunsuppressive Behandlung vor der experimentellen Exposition gegenüber aerosolisierten *Aspergillus*-Konidien in der pilzreaktiven T-Zell-Reaktion bei Schweinen widerspiegeln würde.

4.3.1. Etablierung eines geeigneten Immunsuppressionsregimes

Ziel der immunsuppressiven Medikation war die temporäre Unterdrückung des Abwehrsystems der Tiere zum Zeitpunkt der experimentellen Exposition mit *A. fumigatus*-Konidien. Zu diesem Zweck wurde den Schweinen eine Kombination von Cyclophosphamid und Methylprednisolon (10 mg/kg und 4 mg/kg p.o.) einmal täglich verabreicht. Mangels vergleichbarer Studien zur medikamentösen Immunsuppression beim Schwein, wurden zunächst unterschiedliche Verabreichungsschemata getestet sowie deren Effekte auf die Anzahl der Gesamtleukozyten im Blut verglichen (Abb. 4.14). Um am Tag der *Aspergillus*-Exposition (Tag 0) eine entsprechende Immunsuppression zu erreichen, wurden die Tiere

zunächst 2 Tage vor bis 2 Tage nach der Exposition behandelt (Abb. 4.14A). In Folge dessen konnte jedoch am Tag der Exposition (Tag 0) keine deutliche Reduzierung der Leukozytenzahl erreicht werden. Daher wurden die Tiere anschließend bereits 4 Tage vor bis 2 Tage nach der Exposition therapiert (Abb. 4.14B). Doch auch dieses Zeitregime der Medikation führte am Tag der Exposition nicht zu einer deutlichen Abnahme der Leukozytenzahl im Blut. Schließlich konnte erst durch eine Medikation bereits 6 Tage vor bis einen Tag nach der Exposition eine deutliche Leukopenie an Tag 0 herbeigeführt werden (Abb. 4.14C).

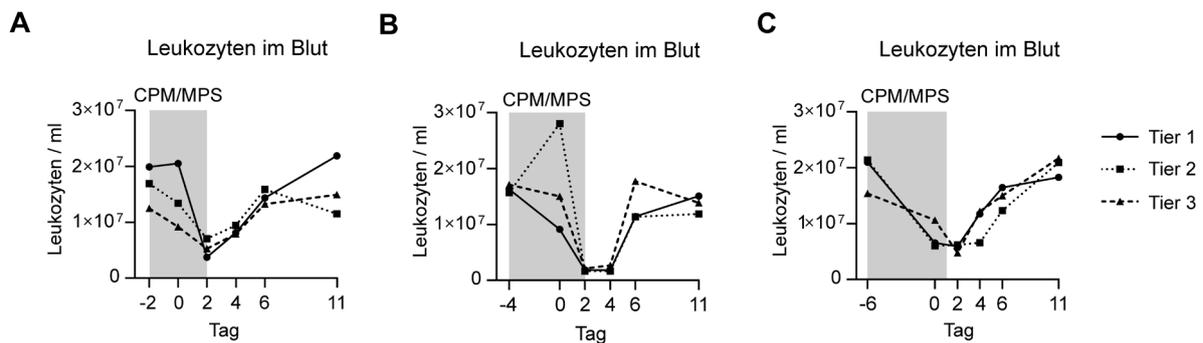


Abb. 4.14 Reduzierung der Anzahl der Leukozyten im Blut von Schweinen in Folge verschiedener Zeitregime der immunsuppressiven Medikation

(A-C) Zeitlicher Verlauf der Gesamtleukozytenzahl im Blut von jeweils 3 Schweinen in Folge der täglichen Behandlung mit Cyclophosphamid (10 mg/kg p.o.) und Methylprednisolon (4 mg/kg p.o.) vor und nach der experimentellen *Aspergillus*-Exposition (Tag 0). Dargestellt sind verschiedene zeitliche Regime der Medikation. Zur Bestimmung der Leukozytenzahl erfolgte bei den Tieren jeweils an Tag -2/-4/-6, 0, 2, 4, 6, und 11 eine Blutabnahme. In (A) wurden die Tiere an Tag -2, -1, 0, 1, und 2 behandelt. In (B) erfolgte die immunsuppressive Medikation an Tag -4, -3, -2, 0, 1 und 2. In (C) wurden die Tiere schließlich an Tag -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0 und 1 behandelt. Der jeweilige Zeitraum der immunsuppressiven Medikation ist grau hinterlegt. CPM = Cyclophosphamid, MPS = Methylprednisolon.

Entsprechend der Ergebnisse wurden die Schweine in den folgenden Versuchen an acht aufeinanderfolgenden Tagen (6 Tage vor Exposition, an Tag 0 und Tag 1) vor und nach der experimentellen *Aspergillus*-Exposition mit Cyclophosphamid und Methylprednisolon behandelt. Wiederum wurden vor (Tag -6, Tag 0) und zu mehreren Zeitpunkten nach der Exposition Blutentnahmen durchgeführt, bevor die Tiere an den Tagen 11 oder 19 sezirt wurden (Abb. 4.15).

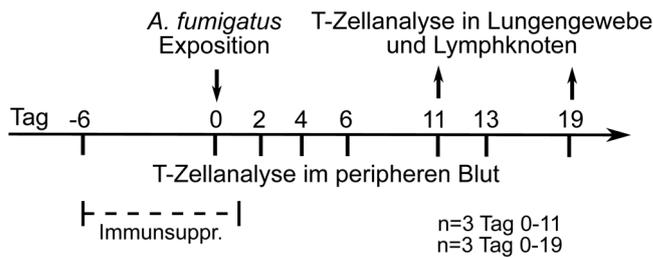


Abb. 4.15 Schema des Versuchsablaufes der experimentellen *Aspergillus*-Exposition immunkomprimierter Schweine in einer Aerosolkammer

Die Schweine wurden 6 Tage vor bis 1 Tag nach der experimentellen Exposition gegenüber *Aspergillus*-Konidien mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt. Pilzspezifische T-Zellen im Blut wurden vor (Tag 0) und an Tag 2, 4, 6, 11, 13 und 19 nach experimenteller Exposition gegenüber *A. fumigatus* analysiert, gefolgt von T-Zell-Analysen in Lungengewebe und Lungenlymphknoten nach der Sektion an Tag 11 (n=3) und an Tag 19 (n=3). Immunsuppr. = Immunsuppression.

Zunächst wurden die Auswirkungen der immunsuppressiven Behandlung im Blut der behandelten Schweine erfasst (Abb. 4.16). Die Medikation mit Cyclophosphamid und Methylprednisolon verursachte eine signifikante Verringerung der Gesamtleukozytenzahl und eine ausgeprägte Neutropenie im Vergleich zu gesunden Schweinen am Tag der aerogenen Exposition mit *Aspergillus*-Konidien (Abb. 4.16A und B). Zusätzlich zu der insgesamt verringerten Anzahl von Lymphozyten im Blut zeigten die zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen auch eine signifikant geringere Proliferationskapazität, was mittels Ki-67-Expression im Vergleich zu nicht immunsupprimierten Schweinen an Tag 0 gezeigt werden konnte (Abb. 4.16B und C).

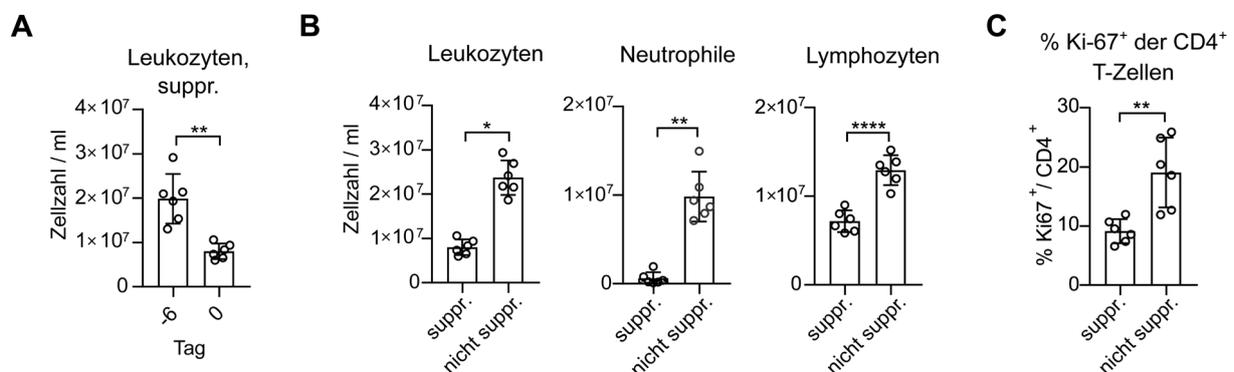


Abb. 4.16 Immunsuppression von Schweinen in Folge der 6-tägigen Behandlung mit Cyclophosphamid und Methylprednisolon

(A) Vergleich der Anzahl der Gesamtleukozyten an den Tagen -6 und 0 der immunsupprimierten Schweine (suppr.), dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; unpaired t

test with Welch's correction. **(B)** Vergleich der Anzahl der Leukozyten (links), neutrophilen Granulozyten (Neutrophile, Mitte) und Lymphozyten (rechts) an Tag 0 von immunsupprimierten (suppr., n=6) und nicht immunsupprimierten (nicht suppr., n=6) Schweinen; unpaired t test with Welch's correction, Mann-Whitney test. **(C)** Vergleich der Frequenz von Ki-67⁺CD4⁺ T-Zellen an Tag 0 von immunsupprimierten (suppr., n=6) und nicht immunsupprimierten (nicht suppr., n=6) Schweinen, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; unpaired t test with Welch's correction.

4.3.2. Ergebnisse der *A. fumigatus*-spezifischen Diagnostik

Die diagnostische *A. fumigatus*-spezifische PCR-Analyse der bronchoalveolären Spülproben (BAL) ergab, dass 3 von 3 der immunkompromittierten Tiere an Tag 11 positiv getestet wurden, verglichen mit 1 von 3 der nicht behandelten Schweine in den vorangegangenen Experimenten. Zu den späteren Zeitpunkten (Tag 18 und 19) wurden 1 von 3 der temporär immunsupprimierten Tiere in der BAL positiv getestet, jedoch im Vergleich keines (0 von 3) der immunkompetenten Schweine (Tab. 4.4, siehe Tab. 4.3). Bemerkenswerterweise wurden keine Anzeichen eines invasiven Pilzwachstums durch PCR-Analyse der Serumproben oder mittels histologischer Untersuchung bei den immunkompromittierten Tieren festgestellt (Tab. 4.4; Abb. 4.17). Daher ist die spezifische Eignung des Schweinmodells hervorzuheben, prädisponierende Faktoren für den Erwerb von *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen zu untersuchen, die sich mit Immunkompetenz und adaptiver antimykotischer Immunität befassen, ohne eine schnelle und irreversible Mortalität der Tiere hervorzurufen.

Versuchstag	Tier	PCR BAL	PCR Serum
11	1	pos (41,3)	neg
	2	pos (46,3)	neg
	3	pos (40,8)	neg
19	1	pos (41,9)	neg
	2	neg	NM
	3	neg	NM

Tab. 4.4 Mittels *A. fumigatus*-spezifischer PCR in BAL und Serum konnte ein invasives Pilzwachstum bei immunkompromittierten Tieren ausgeschlossen werden

Bronchoalveoläre Lavage (BAL) -Proben von immunkompromittierten Schweinen an den Tagen 11 und 19 nach experimenteller Exposition mit aerosolisierten *Aspergillus*-Konidien wurden mittels *A. fumigatus*-spezifischer real-time PCR analysiert. Bei positivem PCR-

Ergebnis der BAL wurden die Serumproben aller Probenahmezeitpunkte (Tag 0, 2, 4, 6, 11, 13, 19) analysiert. Die mittleren Zyklusschwellenwerte sind in Klammern angegeben. Pos, positiv; neg, negativ; NM, not measured = nicht gemessen.

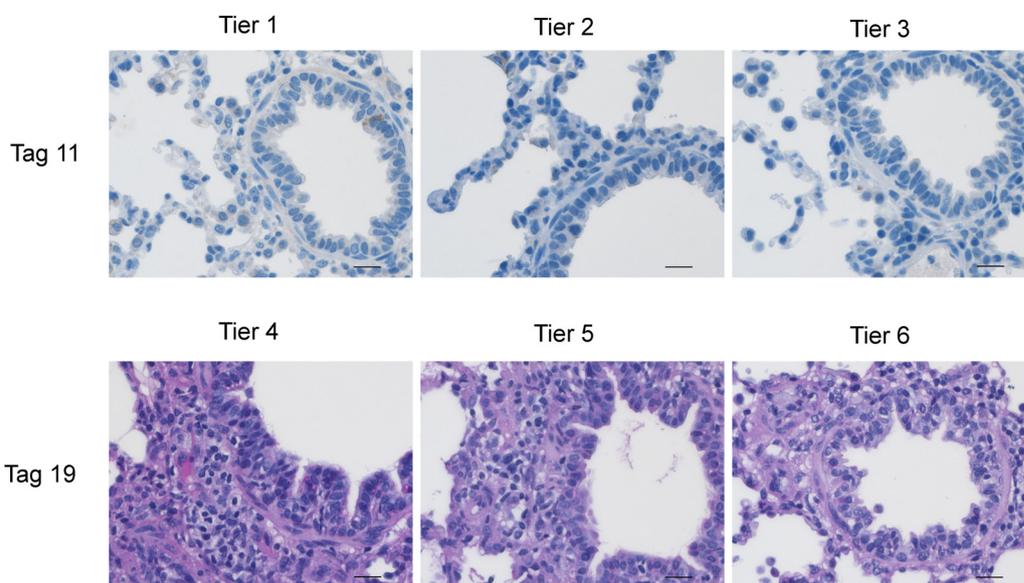


Abb. 4.17 Die histologische Untersuchung ergab kein Hyphenwachstum im Lungengewebe der *Aspergillus*-exponierten, immunkompromittierten Schweine

Histologie des Lungengewebes exemplarisch des cranialen linken Lungenlappens (Lobus cranialis sinister, Pars caudalis) aller experimentell *Aspergillus*-exponierten, immunkompromittierten Schweine. Die Gewebe wurden gesammelt, fixiert, in Paraffin eingebettet und die Gewebsschnitte wurden mit einem Anti-*Aspergillus*-Antikörper für die Immunhistochemie (Tag 11) oder mittels PAS-Reaktion (Abk. für engl. Periodic acid-Schiff reaction) (Tag 19) gefärbt. Maßstab = 20 µm.

4.3.3. Anreicherung und Charakterisierung *A. fumigatus*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen aus Blut und Lungengewebe von immunkompromittierten und immunkompetenten Schweinen im Vergleich

Bei der Überwachung der peripheren Immunantwort mittels Antigen-spezifischer T-Zell-Anreicherung zeigte sich eine zunächst ähnliche Kinetik der Anzahl im Blut zirkulierender *A. fumigatus*-reaktiver CD4⁺ T-Zellen in immunkompromittierten Tieren im Vergleich zu gesunden Schweinen nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition. Lediglich am finalen Untersuchungstag 18 bzw. 19 zeigen die immunkompetenten Tiere einen deutlichen Anstieg der Zahl *A. fumigatus*-reaktiver T-Helferzellen im peripheren Blut im Gegensatz zu den immunkompromittierten Tieren (Abb. 4.18A und B).

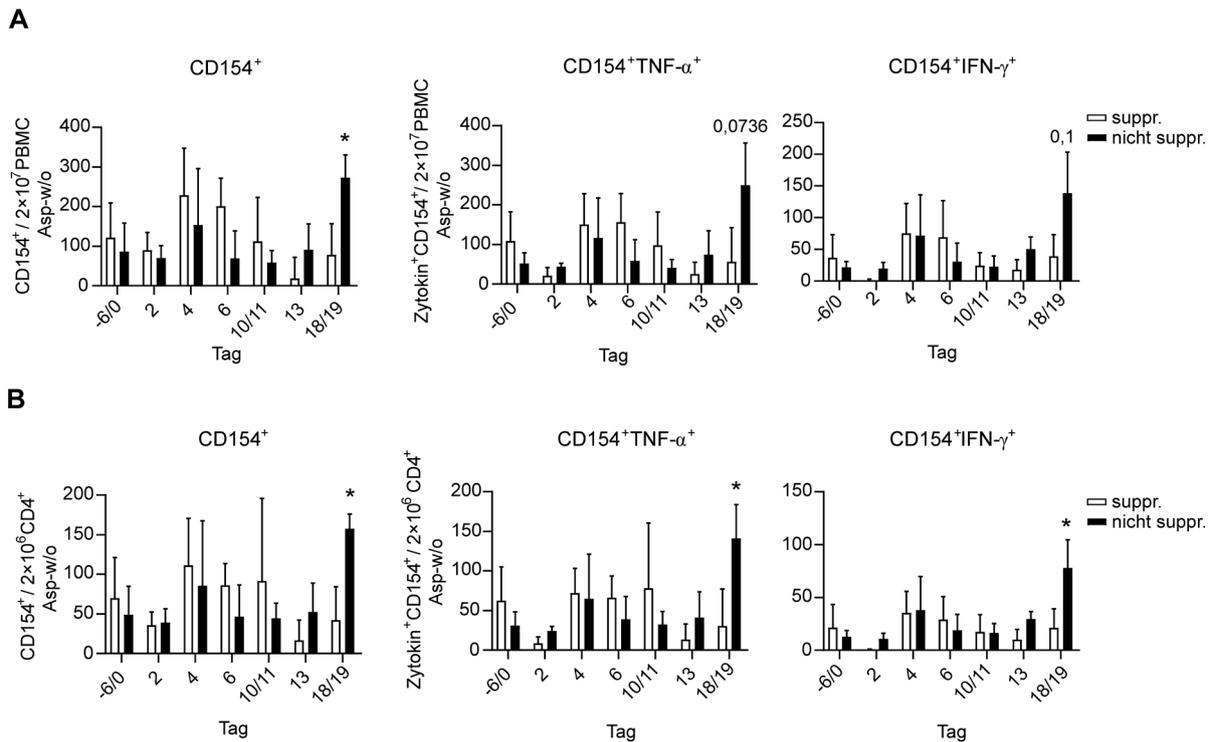


Abb. 4.18 Vergleichbare Kinetik der akuten pilzspezifischen Immunantwort im Blut der immungeschwächten und immunkompetenten Schweine nach *Aspergillus*-Exposition
 Analyse der magnetisch angereicherten *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (links), der TNF- α koexprimierenden CD154⁺ Zellen (Mitte) oder IFN- γ koexprimierenden CD154⁺ Zellen (rechts) an den Tagen -6/0, 2, 4, 6, 10/11, 13 und 18/19 nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition von immunsupprimierten (suppr.) und nicht immunsupprimierten (nicht suppr.) Schweinen. Zusammengefasst in **(A)** für 2x10⁷ PBMC bzw. in **(B)** entsprechend individueller Anteile an CD4⁺ T-Zellen korrigiert und für 2x10⁶ CD4⁺ T-Zellen angegeben, als Mittelwert \pm SD von n=3-6 Schweinen; unpaired t test with Welch's correction zum Vergleich von suppr. und nicht suppr. an Tag 18/19.

Jedoch bei der Gegenüberstellung der lokalen T-Zellantwort im Lungengewebe von immunsupprimierten mit immunkompetenten Tieren an Tagen 10 und 11 sowie 18 und 19 nach experimenteller Exposition konnte anhand der Berechnung der absoluten Zellzahlen, korrigiert für die individuellen Anteile der CD4⁺ T-Zellen in Blut und Gewebe, eine deutliche Verringerung der Anzahl *A. fumigatus*-spezifischer T-Zellen insbesondere an den Tagen 18 und 19 in den Lungengewebe von immungeschwächten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 4.19A). Dies deutet auf eine lang anhaltende Beeinträchtigung der lokalen CD4⁺ T-Zellantwort bei nur kurzzeitiger immunsuppressiver Behandlung. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Zahlen von CD154⁺ sowie von Zytokin-produzierenden pilzspezifischen CD4⁺ T-Zellen in Lungengewebe von immunsupprimierten Tieren die Anzahl *Aspergillus*-spezifischer Th-

Zellen von natürlich exponierten Schweinen (natürliche Umgebungsexposition in konventioneller Tierhaltung) widerspiegeln (Abb. 4.19A). Zudem war auch die prozentuale Zytokinexpression der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen, die aus der Lunge von immunkomprimierten Tieren isoliert wurden (Abb. 4.19B und C), insbesondere 18 bis 19 Tage nach experimenteller Exposition, deutlich verringert im Vergleich zu immunkompetenten Tieren. Interessanterweise zeigten CD154⁺ T-Zellen der Lunge von immunkompetenten Schweinen einen Anstieg der Zytokinproduktion von Tag 10 auf Tag 18, während immungeschwächte Tiere zu beiden Messzeitpunkten ähnliche Werte aufwiesen (Abb 4.19C).

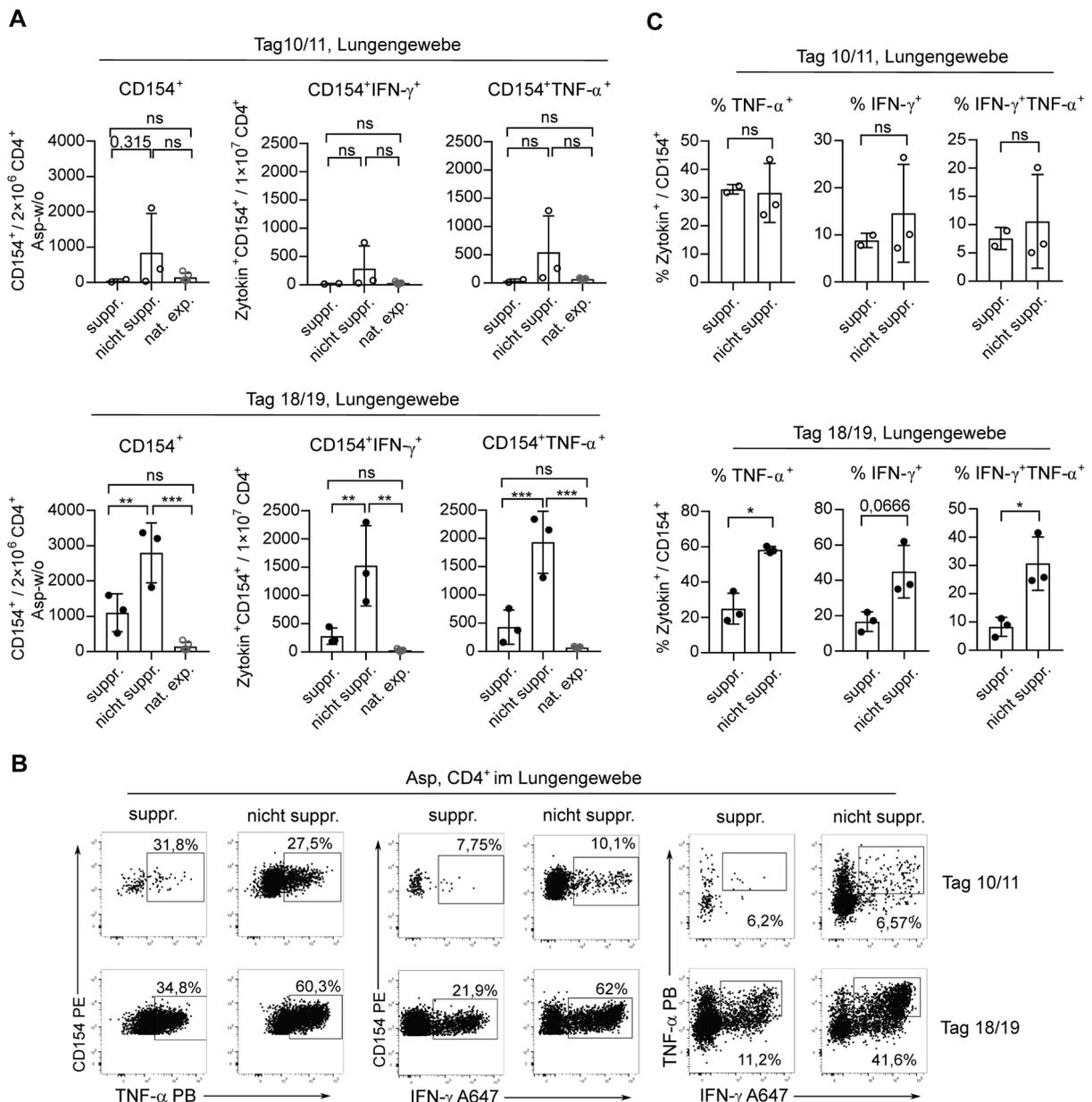


Abb. 4.19 Temporär immunsupprimierte Schweine zeigen lokal im Lungengewebe eine verminderte pilzspezifische T-Zellantwort nach *Aspergillus*-Exposition

(A-C) Ex-vivo-Nachweis von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen nach Antigen-reaktiver Anreicherung. **(A)** Die Zellzahlen von CD154⁺, TNF- α CD154⁺ und IFN- γ CD154⁺ wurden entsprechend der individuellen Anteile CD4⁺ T-Zellen korrigiert und für 2×10^6 CD4⁺ T-Zellen der mononukleären Zellen der Lunge angegeben, die nach experimenteller Exposition mit *A. fumigatus*-Lysat stimuliert wurden. Verglichen wurden immunsupprimierte (suppr., Tag 11, n=2 und 19, n=3), nicht immunsupprimierte (nicht suppr., Tag 10; n=3 und Tag 18; n=3) und natürlich exponierte (nat. exp., n=4) Schweine separat an den Tagen 10/11 (oben) und 18/19 (unten). Der CD154⁺ Hintergrund der nicht stimulierten Kontrolle wurde subtrahiert. Statistische Zusammenfassung als Mittelwert (Balken) \pm SD dargestellt; Daten von Tag 10/11 sind in offenen Kreisen und von Tag 18/19 in schwarz gefüllten Kreisen angegeben; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons. **(B)** Exemplarische Dot Plot-Diagramme von aus der Lunge stammenden Zytokin-koexprimierenden *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen an Tag 10/11 (oberes Feld) und an Tag 18/19 (unteres Feld). Frequenzen der TNF- α produzierenden Zellen (rechts), IFN- γ produzierenden Zellen (Mitte) und TNF- α sowie IFN- γ produzierenden Zellen von immunsupprimierten (suppr.) und nicht immunsupprimierten (nicht suppr.) Schweinen sind angegeben und zusammengefasst in **(C)** für Tage 10/11 für n=2 (suppr.) und n=3 (nicht suppr.) Schweine und Tage 18/19 für n=3 (suppr.) sowie für n=3 (nicht suppr.) Schweine, dargestellt als Mittelwert (Balken) \pm SD; Daten von Tag 10/11 sind in offenen Kreisen und von Tag 18/19 in schwarz gefüllten Kreisen angegeben, unpaired t test with Welch's correction.

Interessanterweise ergab der Vergleich der Zellzahlen von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen im Lungengewebe der immunsupprimierten sowie immunkompetenten Schweine sowie der Resultate der *Aspergillus*-spezifischen Diagnostik, dass Tiere mit geringer Anzahl pulmonaler pilzreaktiver Th-Zellen zudem ein positives Ergebnis der *Aspergillus*-spezifischen PCR der Lungenspülproben aufwiesen, was wiederum Hinweise auf eine gestörte Pilzclearance in der Lunge liefert (Abb. 4.20).

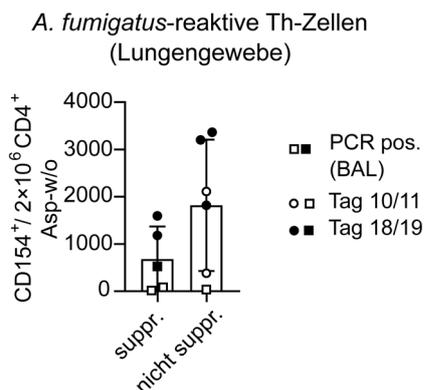


Abb. 4.20 Schweine mit geringer Zahl *A. fumigatus*-reaktiver T-Helferzellen im Lungengewebe nach *Aspergillus*-Exposition zeigen verzögerte Pilzclearance

Vergleich der Zellzahl von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen in Lungengewebe von immunsupprimierten (suppr. n=5) und nicht immunsupprimierten (nicht suppr. n=6) Schweinen. Tiere mit positivem Ergebnis der *Aspergillus*-spezifischen PCR der bronchoalveolären Lavage-Proben sind in Vierecken (schwarz gefüllt oder offen) angegeben. Daten der Tage 10/11 sind in offenen Kreisen oder Vierecken und Daten der Tage 18/19 in schwarz gefüllten Kreisen oder Vierecken angegeben.

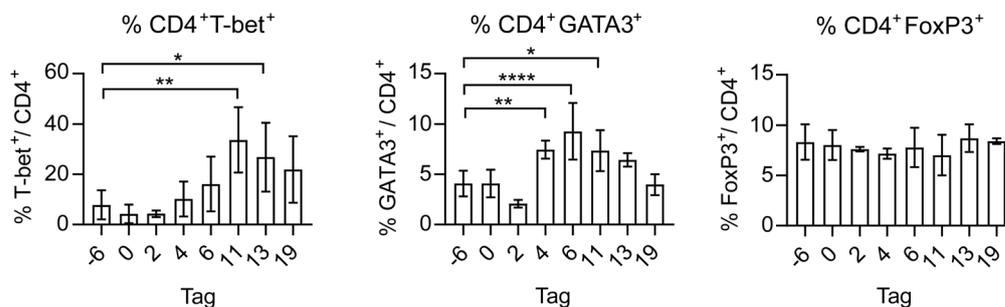
Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine vorübergehende immunsuppressive Behandlung vor der experimentellen Exposition gegenüber *A. fumigatus*-Konidien zu einer signifikanten und langfristigen Verringerung der Menge sowie der Zytokinexpression von pulmonalen, pilzreaktiven CD4⁺ T-Zellen führt. Während sich die frühe Antigen-spezifische T-Zell-Antwort gegenüber *A. fumigatus* im peripheren Blutkreislauf bei immunkomprimierten und immunkompetenten Tieren sehr ähnlich darstellt, spiegelt sich die im Lungengewebe beobachtete langfristige Unterdrückung der pilzspezifischen T-Zellimmunität im späteren Verlauf auch im Blut wider. Darüber hinaus korrelierte die Anzahl an *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen im Lungengewebe mit einer gestörten Pilzclearance.

4.3.4. Antigen-unspezifische Analyse der T-Helferzell-Antwort nach experimenteller Exposition mit *Aspergillus*-Konidien von immunkompromittierten Schweinen

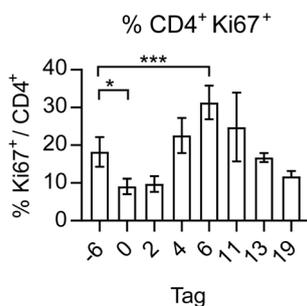
Neben der pilzspezifischen CD154⁺ Th-Zellantwort wurde auch bei den immunkompromittierten Schweinen die gesamte T-Helferzellantwort anhand der Transkriptionsfaktoren T-bet, GATA3 und FoxP3 sowie mittels Proliferations- (Ki-67) und Aktivierungsmarker (CD8α) vor (Tag -6, 0) sowie nach der experimentellen *Aspergillus*-Exposition (Tag 2, 4, 6, 11, 13, 19) analysiert (Abb. 4.21). Während bei immunkompetenten

Tieren bereits an Tag 4 ein signifikanter Anstieg der T-bet-Expression gezeigt wurde (siehe Abb. 4.13), wurde bei den immunkomprimierten Schweinen erst an Tag 11 nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition ein signifikanter Anstieg der T-bet-Expression der CD4⁺ T-Zellen detektiert. Dahingegen stieg die GATA3-Expression der porzinen T-Helferzellen der temporär immunsupprimierten Tiere bereits an Tag 4 nach Exposition signifikant an (Abb. 4.21A). Infolge der immunsuppressiven Medikation (Tag -6 bis Tag 1) wurde die Ki-67-Expression bzw. die Proliferationskapazität der CD4⁺ T-Zellen zunächst signifikant reduziert. Nach Beendigung der medikamentösen Immunsuppression sowie 6 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition wurde zudem ein signifikanter Anstieg der Ki-67- sowie CD8α-Expression der T-Helferzellen detektiert (Abb. 4.21B und C).

A



B



C

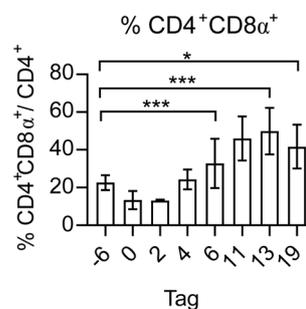


Abb. 4.21 CD154-unabhängige Analyse der T-Helferzellantwort nach *Aspergillus*-Exposition der temporär immunsupprimierten Schweine

(A) Analyse der Frequenzen der T-bet (links), GATA3 (Mitte) sowie FoxP3 (rechts) exprimierenden CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut vor (Tag 0) sowie nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition zusammengefasst für n=6 Schweine (Tag 0 bis 11) sowie n=3 Schweine an Tag 13 und 19, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; one-way-ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. (B) Frequenzen der Ki-67⁺ Zellen aller CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut vor (Tag -6, 0) sowie nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition zusammengefasst für n=6 Schweine (Tag 2 bis 11) sowie n=3 Schweine an Tag 13 und 19, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; one-way-ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. (C) Anteil der CD4/CD8α doppelt-positiven T-Zellen aller CD4⁺ T-Helferzellen im

peripheren Blut vor (Tag -6, 0) sowie nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition zusammengefasst für n=6 Schweine (Tag 2 bis 11) sowie n=3 Schweine an Tag 13 und 19, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test.

4.4. Analyse der akuten *Aspergillus*-spezifische T-Zellantwort im porzinen Lungengewebe nach experimenteller Exposition

4.4.1. Akute pulmonale *Aspergillus*-spezifische Th1-Anwort

Im peripheren Blutkreislauf immunkompetenter sowie immunsupprimierter Schweine konnte an Tag 4 nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition ein Anstieg der *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen dargestellt werden (siehe Abb. 4.10 und 4.18). Dabei ist noch unklar, ob dieser frühe Anstieg von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen womöglich eine Folge der lokalen Expansion und fraglichen Rezirkulation von Gedächtnis-T-Zellen in der Lunge oder auch der Reaktivierung von zirkulierenden Gedächtnis-T-Zellen ist. Daher wurde das Studiendesign zeitlich modifiziert mit dem Ziel, pilzspezifische T-Helferzellen im Lungengewebe bereits 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition bei immunkompetenten Tieren zu analysieren (Abb. 4.22).

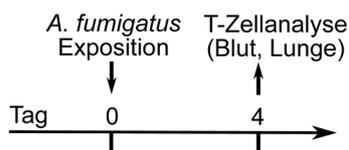


Abb. 4.22 Versuchsschema zur Analyse der akuten pilzspezifischen T-Zellantwort lokal im Lungengewebe nach experimenteller Exposition

Immunkompetente Schweine aus konventioneller Haltung wurden an Tag 0 über 8 h mit einer Konzentration von 10^6 KbE/m³ an aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien exponiert. *Aspergillus*-spezifische T-Zellen wurden an Tag 4 in Blut und Lungengewebe analysiert.

Mittels immunhistochemischer Untersuchung des Lungengewebes der Tiere 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition konnte kein invasives Hyphenwachstum dargestellt werden (Abb. 4.23). Es wurden jedoch vereinzelt positive *A. fumigatus*-Signale in der Lunge detektiert (Abb. 3.22) sowie positive Resultate bei 2 von 3 Tieren mittels *A. fumigatus*-spezifischer PCR in bronchoalveolärer Spülflüssigkeit erzielt. Folglich wurden die inhalieren

A. fumigatus-Konidien nach 4 Tagen noch nicht vollständig aus der Lunge der Schweine gecleart, wobei unklar ist, ob ein lokales Pilzwachstum stattgefunden hat. Da die Untersuchung der entsprechenden Serumproben jedoch negativ ausfiel, kann ein invasives Wachstum des Pilzes ausgeschlossen werden (Tab. 4.5).

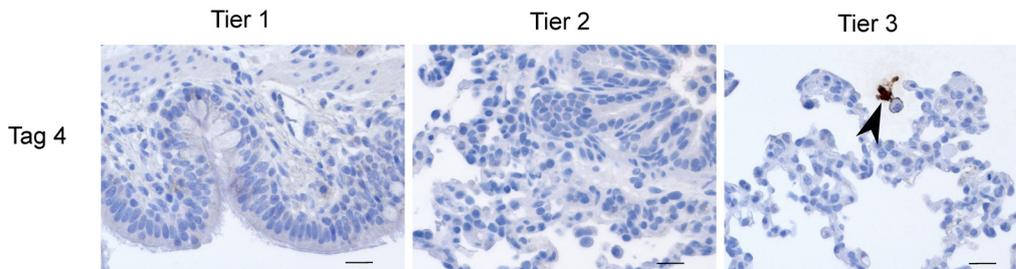


Abb. 4.23 Mittels immunhistologischer Untersuchung konnte kein Hyphenwachstum im Lungengewebe der *Aspergillus*-exponierten Schweine dargestellt werden

Histologie des Lungengewebes exemplarisch des cranialen linken Lungenlappens (Lobus cranialis sinister, Pars caudalis) aller experimentell *Aspergillus*-exponierten, immunkompetenten Schweine. Die Gewebe wurden gesammelt, fixiert, in Paraffin eingebettet und die Gewebsschnitte wurden mit einem Anti-*Aspergillus*-Antikörper immunhistologisch gefärbt. Mittels schwarz gefüllter Pfeile sind vereinzelt nachgewiesene positive *A. fumigatus*-Signale, jedoch ohne Hyphenausprägung, gekennzeichnet. Maßstab = 20 µm.

Versuchstag	Tier	PCR BAL	PCR Serum
4	1	pos (39,4)	neg
	2	neg	NM
	3	pos (40,57)	neg

Tab. 4.5 Mittels *A. fumigatus*-spezifischer PCR in bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit sowie Serum konnte kein invasives Pilzwachstum nachgewiesen werden

Bronchoalveoläre Lavage (BAL) -Proben von immunkompetenten Schweinen an Tag 4 nach experimenteller Exposition mit aerosolisierten *Aspergillus*-Konidien wurden mittels *A. fumigatus*-spezifischer real-time PCR analysiert. Bei positivem PCR-Ergebnis der BAL wurden die entsprechenden Serumproben analysiert. Die mittleren Zyklusschwellenwerte sind in Klammern angegeben. Pos, positiv; neg, negativ; NM, not measured = nicht gemessen.

Mittels magnetischer Anreicherung *A. fumigatus*-spezifischer T-Helferzellen aus Blut und Lungengewebe immunkompetenter Schweine 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-

Exposition konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl pilzspezifischer CD4⁺ T-Zellen sowie Zytokin-produzierender CD154⁺ T-Zellen lokal in der Lunge sowie im peripheren Blutkreislauf dargestellt werden (Abb. 4.24).

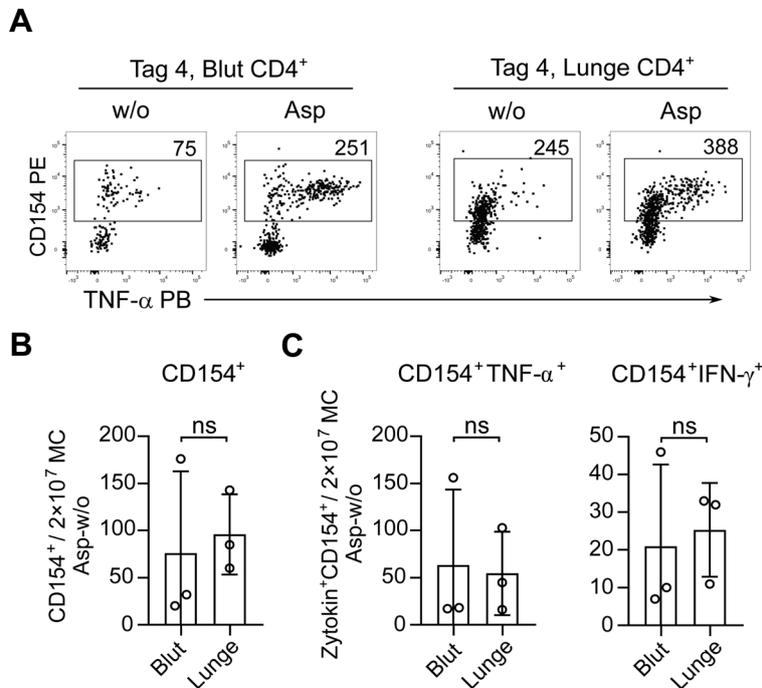


Abb. 4.24 Vergleichende Analyse pilzspezifischer T-Helferzellen in Blut und Lunge gesunder Schweine 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition

(A) Exemplarische Dot Plot-Diagramme von aus Blut und Lungengewebe stammenden magnetisch angereicherten *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen an Tag 4, nicht stimuliert (w/o) oder nach Stimulation mit *Aspergillus*-Lysat (Asp). Anzahl der CD154⁺ *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen sind angegeben und zusammengefasst in (B) für n=3 Schweine, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; Wilcoxon matched-pairs signed rank test. (C) Vergleich der Anzahl pilzreaktiver Zytokin-produzierender CD154⁺ T-Zellen (TNF-α, links und IFN-γ, rechts) in Blut und Lungengewebe an Tag 4 (n=3), dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD. Der CD154⁺ Hintergrund der nicht stimulierten Kontrollen wurde abgezogen; Wilcoxon matched-pairs signed rank test, two-tailed paired t test.

Zudem ergab die vergleichende Analyse der magnetisch angereicherten *A. fumigatus*-spezifischen T-Helferzellen im Lungengewebe bei natürlich durch die Umgebungsluft sowie experimentell exponierten Tieren an Tag 4 nach *Aspergillus*-Exposition keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der angereicherten pilzspezifischen Zellen (Abb. 4.25), was gegen eine schnelle Expansion residenter Gedächtniszellen lokal im Lungengewebe spricht.

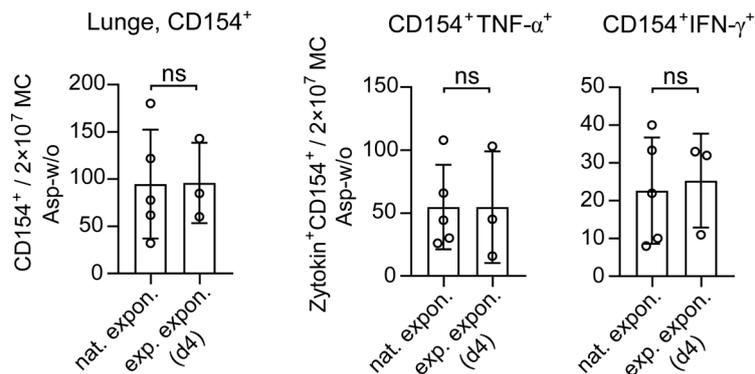


Abb. 4.25 Vergleichende Analyse pilzspezifischer CD4⁺ T-Zellen der Lunge von natürlich sowie experimentell exponierten Schweinen 4 Tage nach *Aspergillus*-Exposition

Vergleich von pilzreaktiven, angereicherten CD154⁺ T-Zellzahlen, die TNF-α (mitte) oder IFN-γ (rechts) im Lungengewebe (Lunge) koexprimieren von n=5 natürlich exponierten Schweinen (nat. expon.) sowie von n=3 Schweinen an Tag 4 nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition (exp. expon, d4), dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD. Der CD154⁺ Hintergrund der nicht stimulierten Kontrollen wurde abgezogen; unpaired t test with Welch's correction.

4.4.2. *Aspergillus*-spezifische Th17-Antwort nach experimenteller Exposition

In humanen Studien konnte gezeigt werden, dass *A. fumigatus*-spezifische T-Helferzellen (Th-Zellen) eine kleine Untergruppe von Th17-Zellen enthalten (Bacher et al. 2014b; Bacher et al. 2019). Bei COPD-Patienten unterscheiden sich jedoch die aus der Lunge und dem peripheren Blut stammenden *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen deutlich in ihrer Fähigkeit, IL-17 zu produzieren (Jolink et al. 2017). Zudem konnten Bacher et al. aufzeigen, dass *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen kreuzreaktiv gegenüber *Candida albicans* (*C. albicans*) sind. *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen, die durch Kreuzreaktivität gegenüber *C. albicans* induziert wurden, expandierten im Menschen selektiv während einer akuten *A. fumigatus*-assoziierten Lungenpathologie. Es wird daher angenommen, dass die atypische Th17-Reaktion aktiv zur Manifestation und/oder Verschlimmerung der Krankheit beiträgt (Bacher et al. 2019).

Während wir in Blut und Lungengewebe gesunder Schweine aus konventioneller Haltung keine signifikante Sekretion von IL17-A detektieren konnten (siehe Abb.4.2), wurden zur gezielten Analyse der möglichen Differenzierung von IL-17-sekretierenden Effektor-/Gedächtniszellen nach Exposition mit hohen Dosen aerosolisierter *Aspergillus*-Sporen im Rahmen des zuvor beschriebenen Versuchsaufbaus ebenfalls 4 Tage nach Exposition die Th17-Antwort im peripheren Blut sowie lokal im Lungengewebe und Lungenlymphknoten untersucht (Abb. 4.26A, B). Gemäß vorheriger Ergebnisse (siehe Abb. 4.2) konnten vor der Exposition (Tag 0) im Blut gesunder Schweine kaum IL-17A-produzierenden *A. fumigatus*-

spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.26C). Auch nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition konnte im peripheren Blut sowie in Lungengewebe und Lungenlymphknoten keine signifikante IL-17A-Produktion dargestellt werden (Abb. 4.26C). Dennoch zeichnete sich insbesondere in der Lunge der Trend einer erhöhten Frequenz IL-17A-produzierender *A. fumigatus*-spezifischer T-Helferzellen ab im Vergleich zu Daten aus dem peripheren Blut (Abb. 4.26C und D). Allerdings zeigte der Vergleich der Frequenz der *Aspergillus*-spezifischen Th17-Zellen in der Lunge der experimentell exponierten Tiere mittels intrazellulärer CD154-Detektion keinen signifikanten Unterschied zu natürlich exponierten Kontrolltieren (Abb. 4.26D).

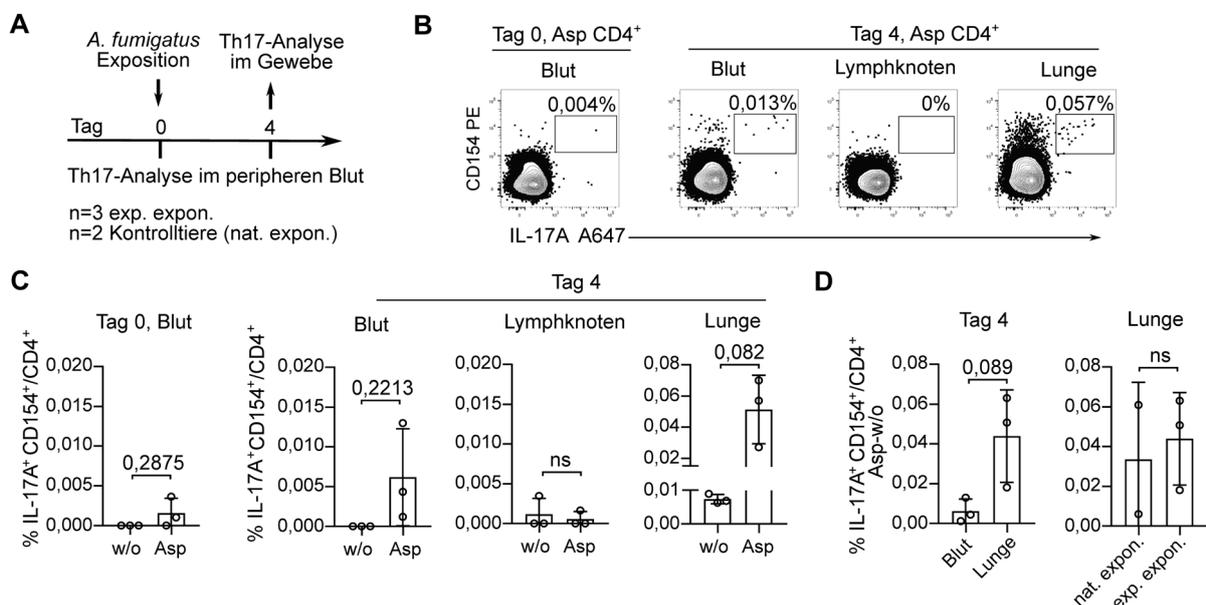


Abb. 4.26 Ex-vivo-Analyse der pilzspezifischen Th17-Antwort in porzinem Blut, Lungenlymphknoten und Lungengewebe nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition (A) Versuchsschema. *Aspergillus*-spezifische T-Zellen wurden an Tag 0 im Blut und an Tag 4 in Blut, Lungenlymphknoten und Lungengewebe von n=3 experimentell exponierten Tieren sowie im Lungengewebe von n=2 Kontrolltieren (natürlich exponiert, nat. expon.) analysiert. (B) Analyse der Frequenzen der *A. fumigatus*-reaktiven CD154⁺IL-17A⁺ T-Zellen im peripheren Blut (Blut), Lungenlymphknoten (Lymphknoten) und Lungengewebe (Lunge) an Tag 0 und 4, zusammengefasst in (C) für nicht stimulierte (w/o) und stimulierte (Asp, 40 µg/ml) PBMCs oder entsprechende mononukleäre Zellen aus dem Lungengewebe oder Lungenlymphknoten, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD an den Tagen 0 (n=3) und 4 (n=3); two-tailed paired t test. (D) Vergleich der pilzreaktiven CD154⁺IL-17A⁺ T-Zellen in Blut und Lungengewebe an Tag 4 (n=3, links) und der pilzreaktiven CD154⁺IL-17A⁺ T-Zellen in Lungengewebe natürlich exponierter Tiere (nat. expon., n=2) und experimentell exponierter Tiere (exp. expon., n=3), dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD. Der CD154⁺ Hintergrund der

nicht stimulierten Kontrollen wurde abgezogen; two-tailed paired t test, unpaired t test with Welch's correction.

Zur detaillierteren Analyse IL-17A-produzierender *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde die Population von *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen expandiert (Ebner et al. 2017), die aus dem Lungengewebe von experimentell sowie natürlich exponierten Schweinen isoliert wurde (Abb. 4.27A). Diese Methode ermöglichte es, die IL-17A-Produktion in einem Re-Stimulations-Assay mit *A. fumigatus*-Antigen beladenen autologen dendritischen Zellen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass expandierte Lungenlymphozyten von experimentell exponierten Tieren die CD154-Expression bei Restimulation mit *A. fumigatus*-Antigen im Vergleich zu expandierten Lungenlymphozyten von natürlich umweltbelasteten Schweinen signifikant hochregulierten (Abb. 4.27C). Darüber hinaus war die IL-17A-Produktion in *A. fumigatus*-spezifischen T-Helferzellen, die 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition aus der Lunge der Tiere isoliert und expandiert wurden, gegenüber derer natürlich umweltbelasteter Schweine signifikant erhöht (Abb. 4.27D, E), was auf einen möglichen Beitrag der Th17-Zellen in der akuten Pathogen-Clearance in der Lunge hinweist.

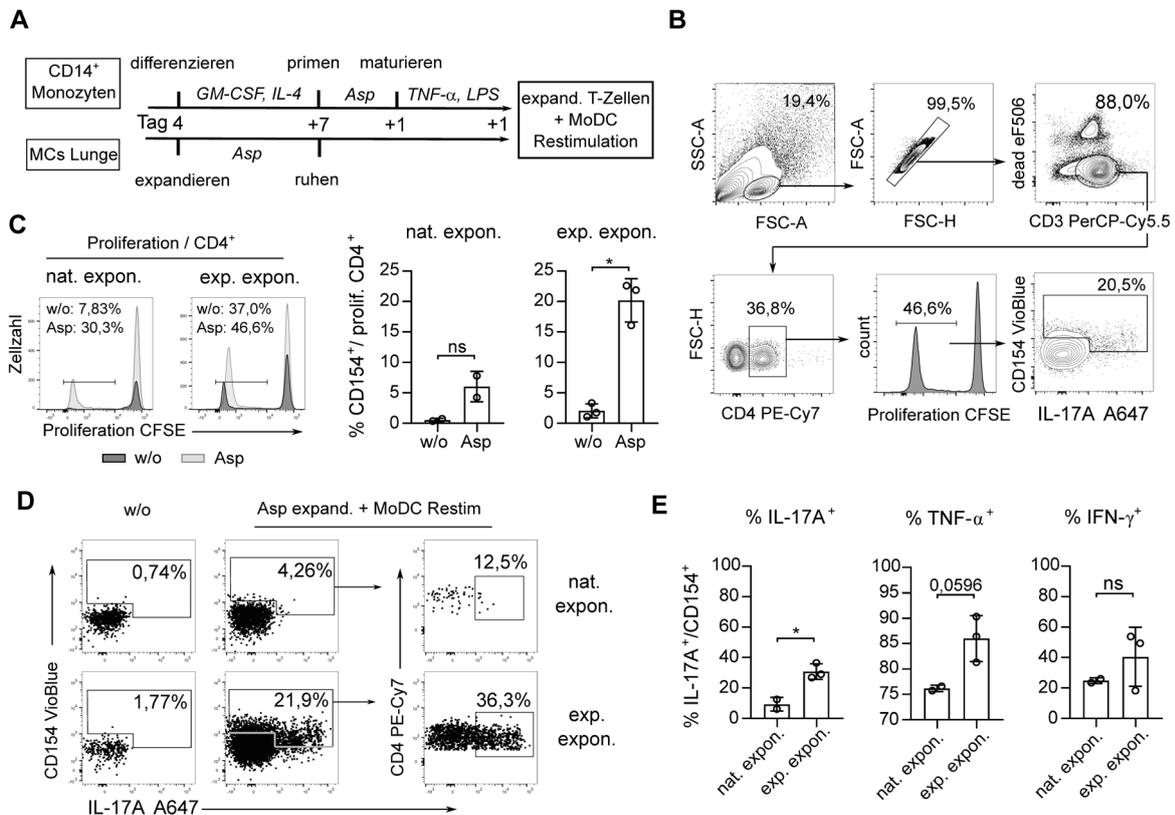


Abb. 4.27 In vitro expandierte *Aspergillus*-spezifische T-Zellen der Lunge experimentell exponierter Tiere zeigen höhere IL-17A Sekretion als natürlich exponierte Schweine

(A) Experimentelles Design. 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition wurden CD14⁺ Monozyten aus der Milz sowie mononukleäre Zellen aus dem Lungengewebe (MCs Lunge) der Schweine isoliert. Die CD14⁺ Monozyten wurden unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 ausdifferenziert, mit *Aspergillus*-Antigen (40 µg/ml) beladen (primen) und schließlich unter Zugabe von TNF-α und LPS maturiert. Die MCs der Lunge wurden unter Zugabe von *A. fumigatus*-Lysat (40 µg/ml) 7 Tage expandiert und anschließend ohne Antigen ausplattiert (ruhen). Die expandierten *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen (expand. T-Zellen) wurden mit *Aspergillus*-beladenen von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDCs) für 6 Stunden restimuliert. (B) Gating-Strategie proliferierter *Aspergillus*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nach Expansion. (C) Exemplarische Histogramme der Proliferation der *Aspergillus*-spezifisch expandierten (Asp, hellgrau) sowie unspezifisch expandierter (w/o, dunkelgrau) CD4⁺ T-Zellen von natürlich exponierten (nat. expon.) sowie experimentell exponierten (exp. expon) Tieren (links), statistisch dargestellt für natürlich exponierte (n=2) sowie experimentell exponierte (n=3) Schweine als Mittelwert (Balken) ± SD; two-tailed paired t test. (D) Exemplarische Dot-Plot-Diagramme unspezifisch expandierter (w/o) sowie *Aspergillus*-spezifisch expandierter T-Zellen nach Restimulation mit *Aspergillus*-beladenen MoDCs (Asp expand. + MoDC Restim) von natürlich exponierten (nat. expon., oben) und experimentell exponierten (exp. expon., unten) Tieren. Dargestellt ist die Frequenz CD154⁺ Th-Zellen (links und Mitte) sowie der IL-17A⁺ T-Zellen aller CD4⁺CD154⁺ T-Zellen. (E) Statistische Zusammenfassung der der Frequenzen der IL-17A⁺ T-Zellen sowie der TNF-α⁺ und IFN-γ⁺ T-Zellen aller CD154⁺ T-Zellen nach *Aspergillus*-spezifischer Expansion sowie Restimulation der natürlich exponierten (nat. expon., n=2) und experimentell exponierten (exp. expon., n=3) Tiere, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; unpaired t test with Welch's correction.

Der Oro-Gastrointestinaltrakt von Schweinen aus konventioneller Tierhaltung ist – im Gegensatz zu Mäusen – zumeist natürlicherweise kolonisiert mit *C. albicans* (Hoefflinger et al. 2014). Auch *C. albicans*-spezifische Th-Zellen wurden im Schwein bereits mittels CD154-Expression detektiert, wobei deren Frequenz bei gesunden Tieren 0,07 bis 0,31 % aller CD4⁺ Th-Zellen betrug (Ebner et al. 2017). Um der These nachzugehen, dass *Aspergillus*-spezifische Th17-Zellen womöglich auch beim Schwein durch Kreuzreaktivitäten mit *Candida albicans* induziert werden, wurden die aus dem Lungengewebe der experimentell *Aspergillus*-exponierten Tiere isolierten sowie expandierten *A. fumigatus*-spezifischen Th-Zellen anschließend mit *C. albicans*-Antigen restimuliert sowie deren IL-17A-Produktion erfasst und mit derer nach *Aspergillus*-Restimulation verglichen (Abb. 4.28). Es konnte gezeigt werden, dass auch nach Restimulation mit *C. albicans*-Antigen eine deutliche IL-17A-Produktion der expandierten *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen detektiert werden konnte, was

erste Hinweise auf eine Induktion porziner gegen andere Pilze gerichteter Th17-Zellen durch Kreuzreaktivität mit *C. albicans* liefert.

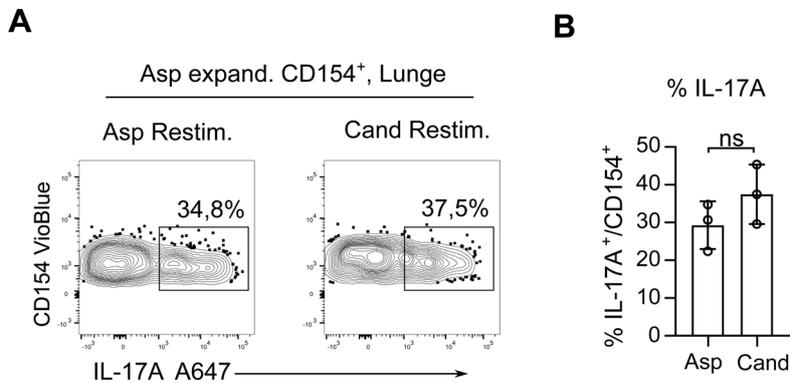


Abb. 4.28 Expandierte *Aspergillus*-spezifische Th-Zellen der porcinen Lunge zeigen nach Restimulation mit *C. albicans*-Antigen eine prominente IL-17A-Produktion

(A) Exemplarische Konturdiagramme expandierter *Aspergillus*-spezifischer Th-Zellen des Lungengewebes (Asp. expand. CD154⁺, Lunge) nach Restimulation mit *Aspergillus*-beladenen MoDCs (Asp Restim., links) und *Candida*-beladenen MoDCs (Cand. Restim., links) von Schweinen nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition. Die Frequenz der IL-17A⁺ T-Zellen aller CD4⁺CD154⁺ T-zellen ist dargestellt und in (B) statistisch zusammengefasst für n=3 Tiere, dargestellt als Mittelwert (Balken) ± SD; two-tailed paired t test.

5. Diskussion

Aspergillus fumigatus ist sowohl bei Menschen als auch bei Tieren für ein großes Spektrum an Erkrankungen verantwortlich (Kosmidis und Denning 2015). Luftgetragene Sporen (Konidien) des Schimmelpilzes sind ubiquitär in der Umgebung vorhanden und werden daher von Mensch und Tier täglich mit der Atemluft aufgenommen. Dennoch wird der Pilz in der Lunge gesunder Individuen meist beseitigt bevor es zu einem Krankheitsgeschehen kommt (Latge 1999; Park und Mehrad 2009). Die angeborene Immunität auf der Ebene der Epithelbarriere sowie der Phagozyten (hauptsächlich Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten) nimmt dabei eine Schlüsselrolle bei der Clearance des Pilzes ein (Latge und Chamilos 2020). Alveolarmakrophagen eliminieren phagozytierte *Aspergillus*-Konidien in angesäuerten Phagolysosomen effizient innerhalb von 24 h infolge der Exposition gegenüber β -Glucanen und anderen immunstimulierenden Molekülen auf der Zellwandoberfläche von geschwollenen Konidien. Neutrophile Granulozyten, deren Rekrutierung durch epithelabhängige sowie durch inflammatorische Monozyten vermittelte Signalwege reguliert wird, verwenden wiederum hauptsächlich ROS-abhängige Tötungsmechanismen gegen intrazelluläre (Konidien) und extrazelluläre (Hyphen) Pilzmorphotypen (Latge und Chamilos 2020). Die Typ I- und Typ III-Interferon-Signalübertragung durch CCR2⁺ inflammatorische Monozyten ist dabei für eine optimale ROS-Produktion in Neutrophilen Granulozyten entscheidend (Espinosa et al. 2017). Insbesondere beim Menschen ist eine schwere Neutropenie der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer invasiven Aspergillose (Latge und Chamilos 2020). Bei stark immungeschwächten Patienten stellen Infektionen mit *Aspergillus* sogar eine der häufigsten Komplikationen mit einer Sterblichkeitsrate von bis zu 50 % dar (Karthaus und Buchheidt 2013; Latge und Chamilos 2020). Daher ist die rechtzeitige Diagnose und folglich sofortige Einleitung einer gezielten antimykotischen Therapie bei *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen der Schlüssel zur Verbesserung der Prognose der betroffenen Patienten (Cornely et al. 2011). Klinische und radiologische Anzeichen zur Diagnose invasiver Aspergillosen sind jedoch meist subtil und unspezifisch und manifestieren sich meist erst im späteren Krankheitsverlauf (Latge und Chamilos 2020). Die mikrobiologische sowie histopathologische Kriterien bei der Diagnose invasiver Schimmelpilzinfektionen sind bisher entscheidend für die Therapieeinleitung, erfordern jedoch oftmals invasive Eingriffe wie Bronchoskopien oder Gewebebiopsien. Trotz zahlreicher Testverfahren für einen direkten oder indirekten Nachweis von *A. fumigatus* aus klinischen Proben (Kultur, Antigen-Nachweis, PCR) ist die mikrobiologische Diagnose der invasiven Aspergillose daher nach wie vor schwierig (Lamoth und Calandra 2017). Neben der angeborenen Immunität spielte bei Patienten nach erfolgter Stammzelltransplantation als auch in Studien an Mausmodellen die adaptive T-Zell-Immunität tatsächlich eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung der

schützenden Abwehr gegen *Aspergillus* (De Luca et al. 2012; Latge und Chamilos 2020). Auch die Existenz spezifisch gegen *A. fumigatus* gerichteter IFN- γ produzierender T-Zellen bei an IPA erkrankten Patienten konnte gezeigt werden sowie deren Beitrag zur Protektion oder Abmilderung des Krankheitsverlauf (Hebart et al. 2002; Potenza et al. 2013). CCR2⁺ inflammatorische Monozyten sowie von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen (Mo-DCs) vermitteln dabei den Transport von *Aspergillus* zu den drainierenden Lymphknoten und initiieren die adaptive T-Helferzellimmunität (Hohl et al. 2009). Ferner deuten zunehmend Studien darauf hin, dass *Aspergillus*-spezifische CD4⁺ T-Zellen die antimykotische Immunantwort des Wirtes orchestrieren (Bacher et al. 2014b). Die Betrachtung der *Aspergillus*-spezifischen T-Helferzellantwort nach magnetischer Anreicherung anhand der CD154-Expression kann dabei wichtige Informationen über den Wirt-Pathogen-Status liefern und diagnostisch für die Kategorisierung von Patientengruppen genutzt werden (Scheffold et al. 2018). Aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit zu menschlichem Probenmaterial ist jedoch unklar, inwiefern die erhobenen T-Zelldaten im Blut mit denen lokal im mukosalen Lungengewebe vergleichbar sind (Jolink et al. 2017). Aufgrund von Ähnlichkeiten der Anatomie der Atemwege und des Immunsystems (Meurens et al. 2012), der natürlichen Exposition gegenüber Pilzaerosolen in der konventionellen Tierhaltung (Oppliger und Duquenne 2016) sowie der Verfügbarkeit einer breiten Palette an etablierten immunologischen Methoden und Instrumenten wurde das Hausschwein als humanrelevantes Großtiermodell eingesetzt, um die adaptive antimykotische Immunantwort gegen *A. fumigatus* zu untersuchen. Dabei wurde neben dem natürlich erworbenen *Aspergillus*-reaktiven T-Helferzellpool bei Tieren aus konventioneller Tierhaltung zudem die pilzspezifische T-Zellantwort nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition in einer Aerosolkammer sowohl immunkompetenter als auch immunkomprimierter Schweine im peripheren Blutkreislauf sowie lokal im Lungengewebe betrachtet. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen sind:

- Natürlich gegenüber *Aspergillus*-Sporen exponierte Schweine aus konventioneller Tierhaltung besitzen CD154⁺ *A. fumigatus*-reaktive T-Helferzellen im Blut in ähnlicher Frequenz, Phänotyp und Differenzierungsstatus, wie bei gesunden Menschen beschrieben wurde. Zudem konnte deren Detektion lokal im Lungengewebe gezeigt werden.
- In Folge einer experimentellen Exposition gegenüber einer definierten Konzentration an *Aspergillus*-Konidien in einer Aerosolkammer wurde eine systemische pilzspezifische CD154⁺ Th1-Zell-Antwort (TNF- α ⁺ und IFN- γ ⁺) bereits nach 4 Tagen sowie zu einem späteren Zeitpunkt nach 18 Tagen induziert. Des Weiteren wurde die Akkumulation der *A. fumigatus*-reaktiven Th1-Zellen lokal im Lungengewebe an Tag 10 und 18 nach experimenteller Exposition gezeigt.
- Die temporäre Medikation mit Immunsuppressiva vor und während der experimentellen *Aspergillus*-Exposition resultierte in einer drastischen Reduktion der lungeninfiltrierenden

pilzspezifischen Th-Zellen über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen. Dahingegen verlief die akute systemische antimykotische T-Zellantwort ähnlich derer immunkompetenter Tiere.

- Infolge der experimentellen *Aspergillus*-Exposition zeigten immunkompetente Schweine bereits nach 4 Tagen eine gesteigerte IL-17A-Sekretion der pulmonalen *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen gegenüber derer natürlich exponierter Tiere aus konventioneller Tierhaltung. Zudem konnte die Reaktivität der porzinen pulmonalen *Aspergillus*-spezifischen Th17-Zellen gegenüber *C. albicans*-Antigen gezeigt werden.
- Bereits 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition wurde zudem eine vermutlich überwiegend nicht *A. fumigatus*-spezifische Th1-Immunantwort Tbet⁺ T-Helferzellen im Blut der immunkompetenten Schweine sowie zeitverzögert an Tag 11 nach Exposition bei den temporär immunsupprimierten Tieren detektiert.

5.1. *A. fumigatus*-spezifische Th1-Zellen in gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung

Bisher wurden bereits verschiedene Säugetierarten als translationale Tiermodelle in der *Aspergillus*-Forschung eingesetzt. Mit einem Anteil von 85 % aller Publikationen werden Mausmodelle jedoch mit Abstand am häufigsten bei der Erforschung *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen angewandt (Lewis und Wiederhold 2005). Insbesondere aufgrund der geringen Körper- und Lungengröße ergeben sich allerdings bei der Maus Limitationen für die Infektionsforschung – etwa bezüglich wiederholter Blutentnahmen – sowie mögliche Unterschiede in der Kinetik des Infektionsverlaufes (Desoubeaux und Cray 2018). Jedoch auch unter Berücksichtigung der jeweiligen Lungenphysiologie und des Einflusses eines breiten Spektrums an Infektionsdosen auf die räumliche Infektionsdynamik konnte mittels virtueller Infektionsmodellierung gezeigt werden, dass die Infektions-Clearance, die sich für realistische Pilzbelastungen ergibt, bei Mäusen effizienter realisiert wird als im Menschen (Blickensdorf et al. 2019). Mögliche Ursachen liefern vergleichende Funktionsanalysen von menschlichen und murinen dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und polymorphkernigen Zellen (PMNs) anhand derer gezeigt werden konnte, dass *A. fumigatus* abweichende Reaktionen in murinen und menschlichen Immunzellen provoziert (Hellmann et al. 2017). Dahingegen ist das Hausschwein im Hinblick auf die Struktur des Tracheobronchialbaumes, die Lungenphysiologie und –größe (Judge et al. 2014), die Anzahl submukosaler Drüsen (Choi et al. 2000) sowie die Anatomie der oberen Atemwege (Horter et al. 2003) eng mit dem Menschen verwandt und spielt daher als humanrelevantes Großtiermodell für respiratorische Infektionserkrankungen eine wesentliche Rolle bei der Übertragung der Forschung an Mausmodellen auf die reale Situation in der Humanmedizin. Neben der Analogie des

Respirationstraktes weist das Hauschwein zudem wesentliche Ähnlichkeiten bezüglich der Zusammensetzung der Immunzellen im Blut, der Funktion der angeborenen Immunzellen, der funktionellen T-Zell-Untergruppen sowie der Zytokinsekretion zum Menschen auf (Meurens et al. 2012). Der Nachweis des Aktivierungsmarkers CD154 (CD40L) auf porzinen T-Zellen zur Identifizierung und Charakterisierung von Antigen-spezifischen T-Zellen ermöglichte zudem die Untersuchung der adaptiven T-Helferzellantwort von Schweinen auf ein definiertes Pathogen (Ebner et al. 2017) und stellte somit eine wesentliche Voraussetzung zur Analyse *Aspergillus*-spezifischer T-Helferzellen im Schwein dar. Für Humanstudien existieren zahlreiche Methoden, um Antigen-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten direkt oder indirekt zur weiteren Charakterisierung zu identifizieren. Für direkte Assays werden Peptid-MHC-Multimere angewandt, wobei MHC II-Multimere zur Identifizierung von Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen noch weniger gut etabliert sind. Indirekte Assays umfassen die Analyse der Zytokinsekretion (via ELISpot Assay [Enzyme Linked Immuno Spot Assay], Fluorospot Assay [fluoreszenzbasiertes Äquivalent], intrazellulärer Färbung oder Zytokin-"Capture"-Assay), der Zellproliferation (via Ki-67, Bromdesoxyuridin, fluoreszierende Tracking-Farbstoffe wie etwa CFSE) sowie von Aktivierungsmarkern (CD40L/CD154, OX40/CD134, PD-L1/CD274, 4-1BB/CD137) (Elias et al. 2020). In Studien zu Influenza oder Circoviren wurde im Schwein bisher zunächst die Zytokinsekretion der CD4⁺ T-Zellen mittels intrazellulärer Färbung nach Antigen-spezifischer Ex-vivo-Restimulation analysiert (Koinig et al. 2015; Talker et al. 2015; Talker et al. 2016). Ebner et. al. konnte wiederum zeigen, dass der Aktivierungsmarker CD154 (CD40L) kurz (5–16 h) nach TCR-abhängiger Antigen-Stimulation auf CD4⁺ T-Zellen hochreguliert wird und auch im Schwein mit Zytokinen koexperimentiert ist. Somit konnten unter Einsatz eines humanen kreuzreaktiven Antikörpers (Klon 5C8) Antigen-reaktive T-Helferzellen im Schwein mittels intrazellulärer CD154-Färbung detektiert werden (Ebner et al. 2017).

Die adaptive antimykotische T-Helferzellantwort beim Menschen hat kürzlich als diagnostisches Tool zur Überwachung des invasiven Pilzwachstums und Identifizierung von Risikopatienten sowie als potenzieller Beitrag zum Schutz vor Pilzinfektionen zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen (Bacher et al. 2015a; Papadopoulou et al. 2019). CD4⁺ T-Helferzellen agieren als zentrale Regulatoren adaptiver Immunantworten gegen extrazelluläre Pathogene wie Pilze. Sie exprimieren T-Zell-Rezeptoren (TCRs) mit einer einzigen Spezifität, die die selektive Erkennung von Epitopen eines Antigens mittels Antigen-präsentierender Zellen ermöglichen. Reife, naive T-Zellen, die aus dem Thymus nach positiver und negativer Selektion mit einer bestimmten Epitopspezifität austreten (Mahnke et al. 2013), sind zunächst kaum oder gar nicht in der Lage, Zytokine zu produzieren und zirkulieren vom Blut über sekundäre lymphatische Organe in die Lymphgefäße und wieder zurück ins Blut. (Fu et al. 2016). Das Homing der naiven T-Zellen zu peripheren Lymphknoten erfolgt dabei über hochendotheliale Venolen (Vestweber 2003) und erfordert die Expression von L-Selektin

(CD62L) und dem Chemokinrezeptor CCR7 (Sackstein et al. 2017). Die Antigenerkennung führt zu einer vorübergehenden Aktivierung der zuvor naiven T-Zelle, gekennzeichnet durch Produktion von Effektormolekülen und Proliferation – folglich der klonalen Expansion der Antigen-spezifischen T-Zellen. Zusätzliche co-stimulierende Signale induzieren eine weitere Differenzierung und stabile Anpassung der T-Zell-Effektorfunktionen und ermöglichen somit optimierte Reaktionen gegen einen bestimmten Erreger. Kürzlich aktivierte T-Zellen (Effektor-T-Zellen), gekennzeichnet durch den Verlust der CD62L- und CCR7-Expression und das Erwerben gewebespezifischer Homing-Moleküle (Sackstein et al. 2017), verlassen die sekundären lymphatischen Organe über die efferenten Lymphgefäße, gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf und wandern zu den peripheren Geweben sowie dem Ort der Entzündung (Fu et al. 2016). Nach der Clearance des Antigens stirbt die Mehrheit der Effektor-T-Zellen und nur ein kleiner Pool an Zellen kehrt in das Ruhestadium zurück, d.h. sie verlieren Anzeichen einer akuten Aktivierung, behalten jedoch die Fähigkeit bei, bei erneuter Exposition gegenüber dem Antigen mit optimierten Effektorfunktionen zu reagieren (sog. Gedächtnis-T-Zellen). Entsprechend der Expression der Oberflächenmarker und deren Zytokinprofil lassen sich beim Menschen folgende Gedächtnis-T-Zell-Typen unterscheiden: Stamm-Gedächtnis-T-Zellen, zentrale Gedächtnis-T-Zellen, transitorische Gedächtnis-T-Zellen, Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sowie Gewebe-residente Gedächtnis-T-Zellen (Mahnke et al. 2013). Zentrale Gedächtnis-T-Zellen sind durch einen CD45RA⁻CCR7⁺ CD62L⁺ Phänotyp gekennzeichnet. Die Expression von CCR7 und CD62L ermöglicht die Extravasation durch hochendotheliale Venolen und nach sekundärem Antigenkontakt haben die Zellen immer noch eine hohe Fähigkeit zur Proliferation sowie Produktion von IL-2. Im Gegensatz dazu haben CD45RA⁻CCR7⁻CD62L⁻ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen eine verringerte Proliferationskapazität, produzieren jedoch schnell große Mengen an Effektorzytokinen wie etwa IFN- γ (Gerner et al. 2015). Gewebe-residente Gedächtnis T-Zellen weisen erhebliche phänotypische Ähnlichkeiten mit Effektor-Gedächtnis-T-Zellen auf (CD45RA⁻CD62L⁻CCR7⁻), exprimieren jedoch zudem CD69 und teilweise CD103. Sie residieren dauerhaft in peripheren Geweben nachdem eine Infektion beseitigt wurde (Mueller et al. 2013). Zusammengefasst führt der Antigenkontakt in vivo zu charakteristischen, sowohl persistenten als auch kurzlebigen Veränderungen der T-Zellzahlen, des Phänotyps und deren Funktion. Somit kann der Antigen-spezifische T-Zell-Pool detaillierte Informationen über den vergangenen, akuten und zukünftigen Wirt-Pathogen-Status liefern (Scheffold et al. 2018). Bei gesunden Menschen, die alltäglich *A. fumigatus*-Konidien einatmen, sind konventionelle CD154⁺ *Aspergillus*-spezifische T-Helferzellen in geringer Frequenz (zwischen 0,06 und 0,37 %) im Blut vorhanden und werden wahrscheinlich durch eine robuste *A. fumigatus*-spezifische regulatorische T-Zell-Antwort unter Kontrolle gehalten (Bacher et al. 2013; Bacher et al. 2014a; Bacher et al. 2016). Die Tatsache, dass auch Hausschweine aus der konventionellen Haltung – im Gegensatz zur

spezifisch pathogenfreien Versuchstierhaltung von Labormäusen – ständig mit Pilzkonidien konfrontiert werden, macht sie zu einem vielversprechenden Modell für die Untersuchung der natürlich erworbenen, adaptiven, antimykotischen Immunität. Ziel dieser Studie war es daher, das Hausschwein als humanrelevantes Großtiermodell für die Analyse der antimykotischen Th-Zell-Reaktionen gegen luftgetragene *A. fumigatus*-Konidien insbesondere lokal in der Lunge zu evaluieren. Es wurde gezeigt, dass gesunde, natürlich exponierte Schweine aus konventioneller Tierhaltung einen Pool an CD154⁺ *A. fumigatus*-spezifischen, zirkulierenden Th-Zellen in ähnlicher Frequenz sowie mit einem ähnlichen Phänotyp besitzen, wie bei gesunden menschlichen Individuen beschrieben wurde (Bacher et al. 2013; Bacher et al. 2014a; Bacher et al. 2014b; Jolink et al. 2014). Während Humanstudien zeigten, dass die Frequenz konventioneller *A. fumigatus*-reaktiver Th-Zellen im Nabelschnurblut fast identisch derer im adulten Blut waren (Bacher et al. 2014a; Vogel et al. 2018), konnte mit der in dieser Studie angewandten Methode keine pilzreaktiven CD4⁺ T-Zellreaktion im Blut von Ferkeln im Alter von nur 3-4 Wochen nachgewiesen werden. Auch wenn eine zu geringe Sensitivität der Detektionsverfahren als mögliche Ursache in Erwägung gezogen werden muss, weist dies auf einen expositionsbedingten Anstieg der Anzahl zirkulierender *A. fumigatus*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen mit zunehmendem Alter der Tiere im Rahmen der kontinuierlichen aerogenen Exposition in konventionellen Tierställen hin (Oppliger und Duquenne 2016). In ähnlicher Weise korreliert auch die pilzspezifische T-Zellantwort bei gesunden Menschen mit deren individuellen, umgebungsbedingten Expositionsniveaus, sodass Personen mit einer intensiven Schimmelpilzbelastung in ihrer beruflichen oder privaten Umgebung erheblich höhere Frequenzen von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen aufweisen (Wurster et al. 2017). In Übereinstimmung mit Daten von gesunden menschlichen Probanden zeigten porcine *A. fumigatus*-reaktive CD4⁺ T-Zellen mehrheitlich einen naiven Phänotyp, was durch fehlende CD8 α - und gleichzeitig vorhandene CD27-Expression gezeigt wurde (Reutner et al. 2013). Die Koexpression von TNF- α und IFN- γ wies zudem auf einen Th1-Phänotyp der zirkulierenden *Aspergillus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Schwein hin (Bacher et al. 2013; Bacher et al. 2014a; Bacher et al. 2014b). Luftgetragene Konidien von *A. fumigatus* werden sowohl von Menschen als auch Tieren täglich eingeatmet und erreichen aufgrund ihrer geringen Größe von 2-3 μ m zudem die Alveolen der Lunge (Latge 1999; Van De Veerdonk et al. 2017a). Immunkompetente Individuen eliminieren den Pilz jedoch – wie bereits beschrieben – effizient durch angeborene Abwehrmechanismen, ohne eine Erkrankung zu entwickeln. Konidien, die die mukoziliäre Clearance der Flimmerzellen des Oberflächenepithels überwinden, werden hauptsächlich direkt von lungenresidenten Alveolarmakrophagen phagozytiert und in angesäuerten Phagolysosomen effizient innerhalb von 24 h eliminiert (Hasenberg et al. 2011; Latge und Chamilos 2020). Während die konidiale Aufnahme durch CCR2⁺ Ly6C⁺ inflammatorische Monozyten zu ihrer Differenzierung in Mo-DCs und zur direkten Abtötung

von Sporen führt, transportieren CCR2⁺ Monozyten sowie von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen auch Konidien oder Antigene zu drainierenden Lymphknoten, wo sie wiederum die Th1-Differenzierung induzieren (Hohl et al. 2009; Rivera et al. 2011; Espinosa et al. 2014). Als entscheidende Voraussetzung zur Analyse der lokalen antimykotischen Th-Zellantwort, gelang zudem der Nachweis CD154⁺ *A. fumigatus*-reaktiver Th-Zellen in aus dem Lungengewebe gesunder Schweine isolierten Leukozyten. Auch die Koexpression von TNF- α und IFN- γ der pilzspezifischen Th-Zellen der Lunge konnte gezeigt werden. IL-17A-produzierende *A. fumigatus*-reaktive CD4⁺ T-Zellen waren jedoch sowohl in Blut- als auch in Lungengewebsproben von gesunden, natürlich exponierten Schweinen kaum nachweisbar, was folglich die Rolle der Th17-Antwort bei der natürlichen *Aspergillus*-Abwehr des Schweines in Frage stellt. Bei der Analyse pilzspezifischer Th-Zellen im Blut gesunder menschlicher Probanden wurde ebenfalls nur ein sehr geringer Anteil *Aspergillus*-spezifischen Th17-Zellen nachgewiesen. Auch die wenigen Daten zu pilzspezifischen T-Zellen in der Lunge gesunder Menschen weisen auf eine sehr geringe IL-17A-Produktion der lokalen *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen hin (Bacher et al. 2019). Beim Vergleich der Frequenzen der *A. fumigatus*-spezifischen Th-Zellen im peripheren Blutkreislauf sowie im Lungengewebe der Schweine konnte nach Abzug des variablen CD154⁺ Hintergrundes in nicht stimulierten Kontrollen kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Auch anhand einer Humanstudie an COPD-Patienten, welche nicht an einer Aspergillose erkrankt waren, konnte gezeigt werden, dass die Frequenzen von *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen in peripherem Blut und Lunge des Menschen ebenfalls ähnlich sind (Jolink et al. 2017).

5.2. Pulmonale Akkumulation porziner, pilzreaktiver Th-Zellen nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition

Bei der Erforschung *Aspergillus*-assoziiierter Erkrankungen anhand eines Tiermodells wurden unterschiedliche Inokulationswege des Pilzpathogens in den Organismus angewandt. Beschrieben wurden folgende Methoden: intravenöse Injektion, intraperitoneale Injektion, intranasale Deposition, intratracheale/intrabronchiale Installation, Inhalation in einer Kammer, intrazerebrale Injektion, intraokulare Injektion/„scraping“ sowie weitere diverse Methoden (Desoubeaux und Cray 2017). Als Vorteile einer intravenösen Inokulation sind homogene, leicht reproduzierbare Infektionen sowie die einfache Standardisierung mit wenigen Tieren zu nennen. Im Allgemeinen sind die ersten Zielorgane intravenöser Injektionsstudien die Nieren und das Gehirn, gefolgt von Milz und Leber (Desoubeaux und Cray 2018). Wie auch im Fall einer intraperitonealen Inokulation ahmt die intravenös induzierte Infektion jedoch keine natürliche Aspergillose nach, die sowohl beim Menschen als auch bei Tieren normalerweise nicht infolge einer Infektion über die Blutbahn oder Bauchhöhle auftritt (Schmidt 2002).

Alternativ kann die intranasale Deposition von Konidiensuspensionen als natürlicher Infektionsweg angesehen werden. Aufgrund der mukoziliären Clearance der oberen Atemwege erreichen im Mausmodell letztlich jedoch nur 10 % der verabreichten Konidien die Lunge (Desoubeaux und Cray 2018). Bei intratrachealen bzw. intrabronchialen Inokulationen wird die Konidiensuspension mittels Tracheotomie in die Trachea oder die Bronchien des Versuchstieres verbracht (Atasever und Gumussoy 2004). Auch wenn dabei eine definierte Menge an Konidien in ein sinopulmonales Organ zur Entstehung einer pulmonalen Aspergillose appliziert werden kann (Kurtz et al. 1995), erfordert ein solch invasiver Eingriff die Narkotisierung des Versuchstieres. Auch nicht-invasive Methoden, wie etwa die Deposition der Konidiensuspension in den caudalen Oropharynx (O'dea et al. 2014; Rohm et al. 2014) sowie neuartige Methoden wie der Einsatz des Microsprayer® Aerosolizer (PennCentury, Wyndmoor, PA, USA) (Chandenier et al. 2009; Kunda et al. 2018) erfordern dennoch eine Anästhesie bzw. sind bisher nur für Nagetiere etabliert. Die Verneblung von *Aspergillus*-Konidien in einer geschlossenen Inhalationskammer stellt dahingegen eine nicht-invasive, stressarme Methode für die Tiere dar, anhand derer die natürliche Pathophysiologie der Aspergillose reproduziert werden kann. Als negativer Aspekt muss jedoch die schwierige Standardisierung des Verneblungsprotokolls bedacht werden, da sich die Tiere in der Kammer frei bewegen und eigenständig atmen. Somit ist die Menge der eingeatmeten Konidien variabel und es können inkonsistente Reaktionen auftreten (Sheppard et al. 2004; Steinbach et al. 2004). Um ein Inhalationsmodell im Schwein zu etablieren, wurde eine Aerosolkammer mit einer Grundfläche von 3,2 m² und einem Volumen von 7 m³ eingesetzt, in der die Tiere über 8 h hinweg einer Konzentration von 10⁶ KbE/m³ an luftgetragenen *A. fumigatus*-Konidien ausgesetzt waren. In Anbetracht der Tatsache, dass in Tierzuchtanlagen *Aspergillus*-Konidienmengen von 100 KbE/m³ in der Luft nachgewiesen wurden, entspricht diese Dosis einer 10⁴-fach erhöhten Exposition. Um die Aufrechterhaltung einer konstanten Konzentration an aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien sicherzustellen, wurden in Voruntersuchungen sowie auch während der experimentellen Exposition der Tiere Luftproben an mehreren Positionen sowie zu zwei Zeitpunkten entnommen und analysiert. Es wurde gezeigt, dass aufgrund des Einsatzes eines Axialventilator in der Kammer sowie der kontinuierlichen Aerosolisierung von Konidiensuspensionen mittels Ultraschallvernebler trotz möglicher Sedimentationseffekte und Anwesenheit der sich frei bewegenden Tiere eine gleichbleibende und homogen verteilte Konzentration an luftgetragenen *A. fumigatus*-Konidien in der Kammer erzeugt wurde. Zur Beurteilung der Pilzbelastung nach erfolgter Inokulation der Konidien wurden in bisherigen Studien verschiedene Methoden angewandt: histopathologische Untersuchungen, mikrobiologische Rekultivierung, Detektion von Galaktomannan/ (1,3)-β-D-Glucan/ Pilz-DNA mittels Enzymimmunoassays (ELISA) oder der Polymerasekettenreaktion (PCR), Bestimmung des Chitingehaltes im Gewebe sowie weitere Biomarker (Desoubeaux und Cray 2018). In

dieser Studie wurde mittels Entnahme von bronchoalveolärer Spülflüssigkeit im Anschluss an die experimentelle *Aspergillus*-Exposition sowie deren Rekultivierung auf Malz-Agar eine Sporenlast von $9,57 \times 10^4$ KbE in der porzinen Lunge errechnet. Des Weiteren wurde unter Einsatz eines *Aspergillus*-spezifischen Real-Time-PCR-Assays nach Extraktion der Pilz-DNA aus der bronchoalveolärer Spülflüssigkeit sowie histologischer Untersuchung des Lungengewebes die erfolgreiche Deposition der Konidien in die Lunge nachvollzogen.

Bis vor kurzem waren fehlende Tools zur direkten Analyse von Pathogen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine wesentliche Einschränkung bei Studien mit Schweinen. Basierend auf der Antigen-reaktiven T-Zell-Anreicherung (ARTE) (Bacher und Scheffold 2013; Bacher et al. 2013) und der Etablierung von CD154 als Marker für porzine Pathogen-reaktive Th-Zellen (Ebner et al. 2017) wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Assay zur Anreicherung von porzinen *A. fumigatus*-spezifischen CD154⁺ Th-Zellen angewandt, dass auf den Einsatz eines für das Schwein derzeit nicht verfügbaren CD40-blockierenden Antikörpers verzichtet. Aufgrund der transienten Natur des CD40-Liganden wurde das sog. „CD154-surface trapping“ sowie die chemische Stabilisierung mittels Monensin zur einer magnetischen Anreicherung genutzt. Chattopadhyay et al. haben den Einsatz eines Fluorochrom-konjugierten CD40L-spezifischen Antikörper während der 6-stündigen In-vitro-Stimulation von CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von Monensin beschrieben. CD40L-spezifische Antikörper binden an CD154-Moleküle, die an einem beliebigen Zeitpunkt während der Stimulation exprimiert werden und Monensin erhöht die Stabilität des gebildeten Komplexes (Chattopadhyay et al. 2006), selbst wenn CD154 internalisiert wird. Dabei wird angenommen, dass Monensin saure intrazelluläre Kompartimente neutralisiert (Chattopadhyay et al. 2005). Zudem wird davon ausgegangen, dass infolge des durch Monensin blockierten Reaktionsweges – im Gegensatz zur Anwendung von Brefeldin A – die Oberflächenexpression von CD154 nicht gestört ist. Gefolgt von der magnetischen Anreicherung der CD154⁺ Th-Zellen ermöglichte es diese Methode, *A. fumigatus*-spezifische T-Zellantworten sowie deren Phänotypen genauer im Schwein zu untersuchen.

Im peripheren Blutkreislauf gesunder Schweine wurde an Tag 4 nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition ein Anstieg der *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen detektiert, gefolgt von einem Abfall an den Tagen 6 und 10, der vermutlich die Migration aktivierter T-Zellen in die Lunge widerspiegelt. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass sowohl CCR2⁺ inflammatorische Monozyten als auch von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen (Mo-DCs) den Transport von *Aspergillus*-Antigen zu den drainierenden Lymphknoten vermitteln, *Aspergillus*-spezifische CD4⁺ T-Zellen primen sowie durch Freisetzung von IL-12 die Entwicklung von Effektor-Th1-Zellen initiieren (Hohl et al. 2009; Rivera et al. 2011; Espinosa et al. 2014). Anhand von In-vitro-Studien wurde zudem der funktionelle Einfluss von Chemokinen, die von humanen *A. fumigatus*-infizierten dendritischen Zellen freigesetzt

wurden, auf die Rekrutierung von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen bewertet (Dewi et al. 2017). Dabei wurde gezeigt, dass *A. fumigatus*-infizierte DCs die Chemotaxis von Effektor-Gedächtnis-Th1-Zellen initiieren, indem sie die Chemokine CCL3, CCL4, CXCL10 and CCL20 freisetzen, welche mit CCR5, CCR6 und CXCR3 auf Th1-Zellen interagieren (Gafa et al. 2007). Somit können Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, die sich hauptsächlich im peripheren Blut befinden, schnell auf entzündliche Chemokine reagieren, die an der Stelle des Pathogeneintritts und der Gewebsverletzung aus DCs freigesetzt werden. Die rekrutierten Th1-Zellen wiederum fördern die Freisetzung von Effektormolekülen in der Lunge, wie z. B. IFN- γ , was letztlich die Abtötungsmechanismen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aktiviert (Gafa et al. 2007). Dabei ist unklar, ob der frühe Anstieg *A. fumigatus*-reaktiver T-Zellen an Tag 4 im peripheren Blutkreislauf die Folge einer lokalen Expansion von im Lungengewebe oder Lungenlymphknoten ansässigen Gedächtnis-T-Zellen und fraglicher Rezirkulation oder der Reaktivierung von zirkulierenden Gedächtnis-T-Zellen darstellt. An Tag 4 nach der Exposition unterscheiden sich die Zahlen der direkt aus den Lungengeweben isolierten *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen jedoch nicht von denen natürlich exponierter Tiere aus konventioneller Haltung, was gegen die frühe Expansion von Th-Zellen lokal im Lungengewebe spricht. Interessanterweise weisen sowohl die peripheren als auch Mukosa-assoziierten Lymphknoten des Schweines eine spezifische Struktur auf, die als invers bezeichnet wird. Dem Gewebe fehlt ein größerer Markbereich und es besteht vorzugsweise aus kortikalen Bereichen und Parakortex. Die Einwanderung von Lymphozyten in das Gewebe des Lymphknotens erfolgt entweder durch afferente Lymphgefäße oder durch hochendotheliale Venolen, wie es bei vielen Arten üblich ist (Rothkötter 2009; Bordet et al. 2019). Nach dem Durchlaufen des Parenchyms des Lymphknotens verlassen die porzinen Lymphozyten den Lymphknoten jedoch wiederum über hochendotheliale Venolen und nicht über efferente Lymphgefäße (Sasaki et al. 1994). Die geringe Anzahl lymphoider Zellen im Ductus thoracicus von Schweinen ist eine Folge dieses Migrationsmusters (McFarlin und Binns 1973). Inwieweit die spezifische Struktur der Lymphknoten des Schweines sowie das Migrationsmuster der porzinen Lymphozyten die mögliche Rezirkulation pilzspezifischer Th-Zellen beeinflusst, sollte in zukünftigen Studien adressiert werden.

Für den möglichen Einsatz *Aspergillus*-spezifischer Th-Zellen als diagnostische Sensoren (Scheffold et al. 2018), ist es entscheidend, ob die Eigenschaften zirkulierender T-Zellen im peripheren Blutkreislauf die lokale Immunantwort im primär betroffenen Organ widerspiegeln. Dabei existieren für den Menschen kaum Daten bezüglich der lokalen *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellantwort in gesunden Probanden (Bacher et al. 2019). Die Daten aus dem Schweinemodell zeigen, dass die Th1-Zytokinsekretion von pilzspezifischen Th-Zellen im Lungengewebe mit derer zirkulierender *Aspergillus*-reaktiver Th-Zellen vergleichbar ist. Die Gesamtzahl der aus dem Lungengewebe isolierten *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

war jedoch drastisch erhöht nach experimenteller Exposition, was auf eine starke Migration in die Lunge oder möglicherweise auch lokale Expansion der pilzspezifischen Th-Zellen exponierter Schweine hinweist. Überraschenderweise trat die Akkumulation der *A. fumigatus*-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Lungengewebe nach Exposition gegenüber hohen Mengen an Konidien nicht unmittelbar auf, sondern steigerte sich über mehr als zwei Wochen nach der *Aspergillus*-Exposition. Folglich konnte keine ausgeprägte lokale Reaktivierung und Expansion von im Lungengewebe residenten *A. fumigatus*-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen innerhalb weniger Tage beobachtet werden. In In-vitro-Studien an humanen *A. fumigatus*-infizierten dendritischen Zellen wurde neben bisher beschriebenen Chemokinen zudem die späte Freisetzung von CCL19 beobachtet, vermutlich in Folge der Migration zu drainierenden Lymphknoten. Somit liegt nahe, dass reife DCs nach Erreichen der drainierenden Lymphknoten an der Rekrutierung von CCR7⁺ naiven T-Zellen beteiligt sind (Gafa et al. 2007). Interessanterweise wurde im peripheren Blutkreislauf der experimentell exponierten Tiere an den Tagen 13 und 18 nach *Aspergillus*-Exposition ein Anstieg *A. fumigatus*-reaktiver Th-Zellen detektiert, möglicherweise in Folge der Rezirkulation differenzierter *Aspergillus*-spezifischer Effektor-Th-Zellen bzw. Gedächtnis-Th-Zellen nach Priming der zur Lunge bzw. drainierenden Lymphknoten rekrutierten naiven T-Zellen. Erwartungsgemäß entwickelten die immunkompetenten Tiere keine klinischen oder makroskopischen Anzeichen für ein invasives Pilzwachstum in der Lunge. Bis auf ein Tier konnten alle gesunden Schweine die Pilzsporen trotz der hohen Expositions dosis innerhalb von 10 bzw. 18 Tagen aus der Lunge eliminieren.

5.3. Drastische Reduktion der pulmonalen *Aspergillus*-reaktiven Th-Zellantwort infolge einer temporären Immunsuppression

Während gesunde Menschen eingeatmete Konidien effektiv aus der Lunge eliminieren ohne eine Erkrankung auszubilden, stellt *Aspergillus* eine der häufigsten Ursachen für infektiöse Komplikationen bei stark immungeschwächten Patienten dar mit einer Sterblichkeitsrate von bis zu 50 % bei Patienten mit akuter Leukämie sowie nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT) (Latge und Chamilos 2020). Folglich lag ein weiterer Fokus dieser Arbeit auf der Analyse des Einflusses einer Immunsuppression auf die adaptive antimykotische T-Zell-Immunität unter Anwendung einer temporären immunsuppressiven Behandlung einer Gruppe von Schweinen. In Tierversuchen zu Erforschung *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen wurden unterschiedliche Regime der immunsuppressiven Medikation beschrieben. Um reproduzierbare invasive Infektionen zu erzeugen, wurden in allen Tiermodellen – ausgenommen Vögel (Arne et al. 2011) – Immunsuppressiva angewandt (Desoubeaux und Cray 2017). Die Tiere werden in der Regel durch wiederholte Injektionen von Alkylantien – einschließlich intraperitonealem Cyclophosphamid – immunsupprimiert mit

dem Ziel einer Neutropenie oder durch subkutane Injektionen von Kortikosteroiden immunmoduliert (Desoubeaux und Chandener 2012; Desoubeaux und Cray 2018). Alkylierende Arzneimittel binden während der Zellreplikation an die DNA und induzieren so eine tiefgreifende Leukopenie (Johnson et al. 2000). Die histologischen und radiologischen Merkmale von Tiermodellen, die mit alkylierenden Arzneimitteln behandelt wurden, waren dabei denen von stark neutropenischen Patienten sehr ähnlich (Chandener et al. 2009). Die Verwendung von Kortikosteroiden ergab dagegen ein differentes Pathogenesemuster, wobei die Funktion der Alveolarmakrophagen beeinflusst und somit eine der ersten natürlichen Barrieren der Infektionsabwehr der Lunge komprimiert wurde. Insgesamt zeigen mit Kortikosteroiden behandelte Modelle eine massive Entzündung mit übermäßiger Rekrutierung von Neutrophilen, die zu einer unzureichenden Pilzbeseitigung führt, wohingegen bei leukopenische Modelle, die durch Alkylantien induziert werden, ein uneingeschränktes Pilzwachstum vorherrscht (Desoubeaux und Cray 2018).

Immunsuppressive Behandlungen sind jedoch bei Schweinen bisher wenig etabliert (Enosawa und Kobayashi 2019). Zudem weisen einige Studien darauf hin, dass Schweine besonders resistent gegenüber einer medikamentös induzierten Immunsuppression sind (Flaming et al. 1994; Dean et al. 2003; Rosen et al. 2020). Da ein invasives Pilzwachstum und folglich der tödliche Krankheitsverlauf bei den Schweinen vermieden werden sollte, wurde die immunsuppressive Medikation in dieser Arbeit sowohl in der Dauer als auch in der Dosierung von Cyclophosphamid und Methylprednisolon beschränkt. Bisher wurde das in Mausstudien zur *Aspergillus*-Forschung häufig eingesetzte Cyclophosphamid nur vereinzelt in Studien mit Schweinen angewandt sowie dessen Effekte beschrieben (Mackie 1981; Harada et al. 2011; Cao et al. 2017; Lee und Kang 2019). Dabei wurde gezeigt, dass trotz starker Reduktion der absoluten Zahlen an neutrophilen Granulozyten, Gesamtleukozyten sowie Lymphozyten die prozentualen Anteile der zirkulierenden T-Zellen nicht beeinflusst wurde (Mackie 1981). Der Einsatz von Cyclophosphamid und Methylprednisolon in dieser Arbeit wurde von den Tieren gut vertragen und führte jedoch erst infolge einer 6-tägigen oralen Verabreichung der Immunsuppressiva zu einer robusten Neutropenie sowie einer signifikanten Verringerung der absoluten Leukozyten- als auch Lymphozytenzahl.

Bei der Analyse der pilzspezifischen Th-Zellantwort im Blut über die Zeit wurde zunächst eine sehr ähnliche Kinetik der Anzahl an *A. fumigatus*-spezifischen Th-Zellen der temporär immunsupprimierten Tiere im Vergleich zu immunkompetenten Schweinen erfasst, gekennzeichnet durch einen Anstieg an Tag 4 nach der experimentellen *Aspergillus*-Exposition und gefolgt von einem späteren Abfall. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine Reaktivierung bereits vorhandener Gedächtnis-T-Zellen dennoch stattgefunden hat und beweisen, dass frühe T-Zell-Reaktionen infolge einer *Aspergillus*-Exposition auch bei immungeschwächten Individuen nachweisbar sind. Die immunsupprimierten Tiere erreichten

jedoch nicht den zweiten Anstieg der zirkulierenden *A. fumigatus*-spezifischen Th-Zellen innerhalb des Untersuchungszeitraumes, der somit möglicherweise von gedrückten Effektor-T-Zellen herrührt. Bemerkenswerterweise konnte anhand einer unabhängigen Kohortenstudie von Hochrisikopatienten mit hämatologischen Erkrankungen, malignen hämatologischen Neoplasien sowie nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation gezeigt werden, dass auch in immunkomprimierten Menschen die relative Häufigkeit von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen innerhalb der zirkulierenden Th-Zellen, welche anhand der Antigenreaktiven T-Zellanreicherung (ARTE) erhoben wurden, ein hervorragendes Potenzial für die Diagnose invasiver Aspergillosen aufweist (Bacher et al. 2015b; Steinbach et al. 2019).

Nach Beendigung der immunsuppressiven Medikation zwei Tage nach der experimentellen *Aspergillus*-Exposition stiegen die Gesamtleukozytenzahlen im Blut der Schweine innerhalb weniger Tage wieder auf deren Ursprungswerte an. Die hier angewandte zeitlich begrenzte immunsuppressive Medikation reduzierte jedoch die Anzahl der in der Lunge akkumulierenden *A. fumigatus*-spezifischen und Zytokin-produzierenden Th-Zellen bei experimentell exponierten Tieren drastisch. Ob dies eine mögliche Folge einer verminderten Phagozytose (Santoso et al. 2002) der Pilzsporen und Antigenpräsentation (Rozkova et al. 2006) oder einer verminderten Migrationskapazität von Mo-DC (Chen et al. 2004; Cao et al. 2013) ist, muss in zukünftigen Studien noch untersucht werden. Trotz der vorübergehenden Immunsuppression konnte bei keinem der Schweine ein invasives Pilzwachstum detektiert werden, obwohl alle immunkomprimierten Tiere an Tag 11 sowie 1 von 3 Tieren an Tag 19 mittels PCR von bronchoalveolärer Spülflüssigkeit positiv auf die Internal transcribed spacer 1 (ITS1) -5.8S-rRNA-Genregion von *Aspergillus* getestet wurden. Aufgrund der Tatsache, dass weder mittels *Aspergillus*-spezifischer PCR von Serumproben noch in histologischen Untersuchungen ein invasives Pilzwachstum nachvollzogen werden konnte, wurden diese Befunde als gestörte Clearance bzw. Eliminierung der *A. fumigatus*-Konidien in der Lunge der immunkomprimierten Tiere interpretiert. Dies könnte – wie bereits erwähnt – mit einer verringerten Präsentation von *Aspergillus*-Antigenen durch CCR2⁺ Monozyten sowie von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen und folglich mit einer geringeren Instruktion von *A. fumigatus*-spezifischen Th-Zellen einhergehen. Ohne sofortiges invasives Pilzwachstum, das zu hohen Sterblichkeitsraten führen würde, kann mit Hilfe des Schweinemodells untersucht werden, inwieweit Antigen-spezifische Th-Zellen zum Schutz invasiver Pilzinfektionen beitragen. Des Weiteren können prädisponierende Faktoren – etwa der Immunstatus, Umwelteinflüsse wie Luftfeuchtigkeit und Umgebungstemperatur oder auch nutritive Faktoren – oder sogar spezifische Kippunkte bei der Entstehung einer Aspergillose analysiert werden.

Bei gesunden Tieren war sowohl ein deutlicher Trend der Zunahme der CD154⁺ T-Zellzahlen lokal in der Lunge als auch der Anstieg der Zytokinproduktion bei dem Vergleich der Tage 10

und 18 zu verzeichnen. Dahingegen war der Anteil der Th1-Zytokin-produzierenden *Aspergillus*-spezifische T-Zellen bei den temporär immunsupprimierten Tieren fast unverändert. Bisherige Studien legen nahe, dass das vollständige Differenzierungsprogramm von geprimten *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen in kompetente Th1-Zellen erst bei Ankunft in der Lunge stattfindet und daher schrittweise erfolgt (Rivera et al. 2006; Lionakis et al. 2017b). Bei immungeschwächten Tieren konnte eine solche Entwicklung des Phänotyps nicht nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass *A. fumigatus*-spezifische Th-Zellen, die in die Lunge gelangten, keine zusätzlichen lungenspezifischen Differenzierungssignale erhielten, um das Th1-Programm vollständig zu instruieren. Aus Studien an IFN- γ - sowie IL-12p35-defizienten Mäusen geht hervor, dass insbesondere IL-12 als auch IFN- γ essentielle Faktoren bei der Th1-Differenzierung sind (Rivera et al. 2011). IL-12 wird hauptsächlich von dendritischen Zellen sekretiert und fördert die IFN- γ -Sekretion der NK-Zellen sowie die Th1-Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen. IFN- γ ist das charakteristische Zytokin, das von Th1-Zellen produziert wird, und spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Th1-Differenzierung, während alternative Th2- und Th17-Programme unterdrückt werden. Die angeborene Produktion von IFN- γ stammt größtenteils aus NK-Zellen, obwohl auch DCs bei TLR-Stimulation IFN- γ produzieren können (Espinosa und Rivera 2012). Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie TLRs – welche das Adaptorprotein MyD88 aktivieren – und Dectin-1 beeinflussen dabei die pilzspezifische Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen über die differentielle Induktion der Zytokinsekretion von dendritischen Zellen, insbesondere von Mitgliedern der IL-12-Familie (Goriely et al. 2008). MyD88-Signale begünstigen die Th1-Differenzierung und als Reaktion auf eine Infektion mit *A. fumigatus* tragen MyD88-Signale zur T-Bet-Induktion in den Lymphknoten der Lunge bei. *Aspergillus*-spezifische Th-Zellen in MyD88-defizienten Mäusen zeigen zudem eine begrenzte IFN- γ -Produktion in der Lunge (Rivera et al. 2006). Beim Transport in die Lunge nahm die T-Bet-Expression jedoch in *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen in Wildtyp- und Myd88-defizienten Mäusen in ähnlicher Weise zu. Die MyD88-unabhängigen Differenzierungssignale, die von Antigen-spezifischen T-Zellen in der Lunge empfangen werden, könnten durch direkten Kontakt mit residenten Zellen wie Alveolarmakrophagen oder DCs oder durch das an der Entzündungsstelle vorhandene Zytokinmilieu vermittelt werden (Rivera et al. 2006). Zudem bleibt interessanterweise die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in den Lymphknoten der Lunge bei Mäusen erhalten, denen MyD88 und Dectin-1 fehlen, was auf die wichtigen Beiträge anderer angeborener Rezeptoren zur DC-Reifung und zum Priming von CD4⁺ T-Zellen hinweist (Rivera et al. 2011). Die Beobachtungen bezüglich der porzinen pulmonalen pilzspezifischen T-Zellen sind besonders interessant im Hinblick auf die zeitbegrenzte immunsuppressive Behandlung und sollten bei Patienten mit kurzen Phasen einer Immunsuppression Bedacht werden, bei denen bisher nicht von einem hohen Risiko für eine gestörte antimykotische Immunität

ausgegangen war. Die Auswirkungen des Zeitpunktes, der Dauer sowie der Dosierung von Cyclophosphamid und Methylprednisolon auf angeborene Immunzellen der Lunge des Schweines wurden bisher nicht ausführlich untersucht und sollten in zukünftigen Studien adressiert werden. Anhand von In-vitro-Studien an von Monozyten abgeleiteten unreifen dendritischen Zellen, isoliert aus einem durch Cyclophosphamid immunsupprimierten Rattenmodell, wurde der Einfluss des hochdosierten Immunsuppressivums auf die Fähigkeit zur Antigenaufnahme, T-Zell-Priming, Zytokinproduktion und Oberflächenmarkerexpression sowie in Kokultur mit CD4⁺ T-Zellen auf die Th-Polarisation und TLR/MyD88/MAPK-Signalwege untersucht (Bao et al. 2020). Dabei konnte gezeigt werden, dass CD103⁺ DCs der Milz von mit Cyclophosphamid behandelten Ratten in ihrer Zellzahl reduziert sowie in der Expression ihrer Oberflächenmarker verändert waren. In In-vitro-Versuchen schwächte hochdosiertes Cyclophosphamid die Antigenaufnahmekapazität von isolierten von Monozyten abgeleiteten unreifen dendritischen Zellen, erhöhte jedoch deren T-Zell-Priming-Kapazität. Die TLR-, MyD88- und MAPK-Expressionsniveaus, die an der Vermittlung der Th-Zell-Polarisation beteiligt sind, waren interessanterweise ebenfalls signifikant erhöht (Bao et al. 2020). Im Hinblick auf die reduzierte Anzahl Th1-Zytokin-produzierender *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen bei mit Cyclophosphamid behandelten Schweinen lokal in der Lunge im Vergleich zu gesunden Tieren nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition müssen somit auch im Schwein MyD88-unabhängigen Differenzierungssignale zur Instruktion eines Th1-Programmes in Betracht gezogen werden. In Studien an humanen von Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass auch Glucocorticoide wie Methylprednisolon die Differenzierung und Antigen-präsentierende Funktion dendritischer Zellen beeinträchtigen. Die Zugabe von Glucocorticoiden während des Reifungsprozesses reduzierte die IL-12 p70- und TNF-Produktion sowie die T-Zell-stimulierende Funktion der DCs dabei signifikant (Rozkova et al. 2006). Inwieweit die Behandlung mit Cyclophosphamid und Methylprednisolon im Schweinmodell zu einer verminderten Differenzierung und T-Zell-stimulierende Funktion der Mo-DCs und folglich verminderten Instruktion *Aspergillus*-spezifischer Th1-Zellen in der porzinen Lunge geführt hat, muss in zukünftigen Studien adressiert werden.

5.4. *Aspergillus*-reaktive Th17-Antwort lokal im Lungengewebe experimentell exponierter Tiere

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Dectin-1-abhängige Produktion von IL-23 mit der Fähigkeit des Rezeptors assoziiert ist, die Erzeugung der gegen *Aspergillus* gerichteten Th17-Immunität zu fördern (Espinosa und Rivera 2012). Die Produktion von IFN- γ und IL-12 war in Mäusen mit Dectin-1-Mangel gesteigert, was wiederum darauf hindeutet, dass Dectin-1-Signale die Produktion dieser zur *A. fumigatus*-spezifischen Th1-

Differenzierung notwendigen Zytokine verringern (Rivera et al. 2011). Zudem formieren Calcineurin-NFAT-Signalwege in CD103⁺ dendritischen Zellen die optimale Induktion von Th17-Reaktionen in der Lunge über die Produktion von IL-2. Von DCs freigesetztes IL-2 ist dabei für die Abschwächung und Kontrolle der Pathogenität von Th17-Zellen während der akuten Phasen der pulmonalen Aspergillose verantwortlich (Zelante et al. 2015). Insgesamt konnte jedoch bisher bezüglich der physiologischen Abwehr gegen *A. fumigatus* keine definitive Bedeutung der Th-17-Immunität gezeigt werden (Latge und Chamilos 2020). Mittels der Antigen-spezifischen T-Zell-Anreicherung (ARTE) (Bacher und Scheffold 2013; Bacher et al. 2013) von CD154⁺ *A. fumigatus*-spezifischen Th-Zellen aus dem Blut gesunder Menschen konnte gezeigt werden, dass nur ein sehr geringer Anteil der *Aspergillus*-reaktiven Th-Zellen IL-17 sekretiert (Bacher et al. 2019). Wie bereits beschrieben, waren *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen sowohl in Blut- als auch in Lungengewebsproben von gesunden, natürlich exponierten Schweinen ebenfalls kaum nachweisbar. Die Th17-Immunität gegen *Aspergillus* wird zudem zunehmend mit allergischen Lungenerkrankungen assoziiert. *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen wurden im Lungengewebe von CF- (Chan et al. 2013; Bacher et al. 2019) und COPD-Patienten (Jolink et al. 2017) nachgewiesen. Auch im Blut von Patienten mit CF, COPD und Asthma wurden erhöhte Werte *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen detektiert (Bacher et al. 2019). Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass *Aspergillus*-spezifische Th17-Zellen ausschließlich im akuten Stadium der ABPA stark erhöht sind und sich nach entzündungshemmender und antimykotischer Therapie normalisieren, während *A. fumigatus*-reaktive Th1- und Th2-Zellen von dieser Entwicklung unberührt blieben. Die starke Assoziation der erhöhten IL-17A-Immunantwort mit der akuten ABPA sowie deren spezifische Abnahme während der Therapie legt nahe, dass diese atypische Th17-Antwort aktiv zur Manifestation und/oder Verschlimmerung der Krankheit beiträgt (Bacher et al. 2019). In Mausstudien konnte bereits gezeigt werden, dass IL-17-produzierende T-Zellen die Extravasation von Eosinophilen aus dem Blut in die Lunge antreiben und die *Aspergillus*-spezifische Th2-Zellexpansion fördern als zentrales pathogenetisches Ereignis einer allergischen Lungenentzündung (Murdock et al. 2012). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit unter Zuhilfenahme eines Antigen-spezifischen Expansionsprotokolls porziner *A. fumigatus*-reaktiver Th-Zellen gezeigt werden, dass die experimentelle Exposition mit aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien bereits nach 4 Tagen ebenfalls zu einem Anstieg der IL-17-Sekretion *Aspergillus*-reaktiver Th-Zellen gegenüber derer natürlich exponierter Schweine führte. Bei Challenge-Versuchen an Mäusen entwickelten sich Th17-Zellen in der Lunge erst nach 8 intranasalen Expositionen gegenüber *Aspergillus*-Konidien assoziiert mit einer chronischen pulmonalen Th2-Entzündungsreaktion (Murdock et al. 2012). Interessanterweise wurde bei den Schweinen infolge der pulmonalen Exposition mit hohen Antigen Dosen über einen Zeitraum von 8 Stunden eine gesteigerte Th17-Antwort bereits nach 4 Tagen induziert.

Eine mögliche Erklärung könnten jüngste Studien zur Herkunft der *A. fumigatus*-reaktiven Th17-Zellen im Menschen liefern.

Entgegen der *A. fumigatus*-spezifischen T-Helferzellreaktion löst *C. albicans* die stärkste beschriebene Th17-Immunantwort im Menschen gegen einen spezifischen Mikroorganismus aus und übertrifft dabei *Staphylococcus aureus* (Bacher et al. 2016) als weiteren wesentlichen Th17-Induktor (Zielinski et al. 2012). Humane Th17-Zellen sind entscheidend für den Schutz gegen mukokutane *C. albicans*-Infektionen. IL-17 vermittelt die antimykotische Wirtsabwehr, indem es die Rekrutierung von Neutrophilen an die Infektionsstelle koordiniert und die Expression von antimikrobiellen Peptide – wie etwa β -Defensine, Calprotectin oder Mucine – an Schleimhautoberflächen hochreguliert (Hernandez-Santos und Gaffen 2012; Mengesha und Conti 2017). Patienten mit eingeschränkter Th17-Immunität leiden daher häufig an mukokutaner Candidiasis und in geringerem Maße an Infektionen mit *S. aureus* (Li et al. 2018). Jüngste Studien in Menschen legen nahe, dass bei Befall mit *A. fumigatus* sowie weiteren Pilzspezies kreuzreaktive T-Zellen aus einer bereits vorhandenen *C. albicans*-spezifischen Th17-Antwort rekrutiert werden und nicht mittels Priming naiver T-Zellen. Bemerkenswerterweise wurden bereits mehrere Candida-Proteine (etwa das Mannose-Protein Mp65) identifiziert, die kreuzreaktive immunogene Epitope mit *Aspergillus*-Proteinen teilen (Bacher et al. 2019). Es konnte zudem gezeigt werden, dass *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen, die durch Kreuzreaktivität mit *C. albicans* induziert werden, während einer akuten *Aspergillus*-assoziierten Lungenpathologie selektiv expandiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die gesamte antimykotische Th17-Modulation durch *C. albicans* ein pathogenes Entzündungsgeschehen der Atemwege fördert, welches durch aerogene Pilzsporen bei anfälligen Patienten mittels selektiver Rekrutierung kreuzreaktiver Th17-Zellen ausgelöst wird (Bacher et al. 2019). Im Gegensatz zu Mäusen ist der Oro-Gastrointestinaltrakt von Schweinen aus konventioneller Tierhaltung zumeist natürlicherweise kolonisiert mit *C. albicans* (Hoeflinger et al. 2014). Zudem wurden *C. albicans*-spezifische Th-Zellen im Schwein bereits mittels CD154-Expression detektiert, wobei deren Frequenz bei gesunden Tieren 0,07 bis 0,31 % aller CD4⁺ Th-Zellen betrug (Ebner et al. 2017). Anhand dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass expandierte *Aspergillus*-spezifische Th-Zellen auch nach Restimulation mit *C. albicans*-Antigen IL-17A sekretieren. Daher liegt nahe, dass auch im Schwein pilzspezifische Th17-Zellen durch Kreuzreaktivität mit *C. albicans* induziert werden. Während Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Kreuzreaktivitäten im Allgemeinen bei Mäusen, die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten werden, begrenzt sind, bietet das Schwein als translationales Modell folglich die wesentlichen Voraussetzungen für zukünftige Studien zur Analyse der kreuzreaktiven pilzspezifischen Th17-Zellantwort.

5.5. T-Zell-Rezeptor-unabhängige Aktivierung porziner Th1-Zellen nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition

Anhand der Untersuchung CD154⁺ *Aspergillus*-spezifischer T-Helferzellen im Menschen konnte gezeigt werden, dass die Antigen-spezifische T-Zell-Antwort hauptsächlich gegen metabolisch aktive *A. fumigatus*-Morphotypen gerichtet sowie gegenüber Membranproteinfraktionen im Vergleich zu Zellwand- oder cytosolischen Proteinen stärker ausgeprägt ist. Die spezifische Analyse von 15 ausgewählten *A. fumigatus*-Proteinen ergab jedoch ein sehr unterschiedliches Reaktivitätsmuster, das sowohl von Spender als auch Protein abhängig war (Bacher et al. 2014b). Entgegen der Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort werden die sog. Bystander T-Zellen unabhängig von T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signalen aktiviert. Diese Art der Antigen-unabhängigen T-Zell-Aktivierung wurde bei entzündlichen Geschehen beobachtet, einschließlich Autoimmunitäten, Krebserkrankungen sowie am häufigsten während einer Infektion (Whiteside et al. 2018b). Bystander T-Zellen wurden erstmals detektiert in Mausmodellen zur Infektion mit dem *Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus* (LCMV), dem *Vacciniavirus* und *Vesicular stomatitis virus*, die zur Proliferation und Expansion von (polyklonalen) T-Zellen führten (Tough et al. 1996). Zudem wurden auch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) mit der nicht Antigen-spezifischen T-Zell-Stimulation verknüpft, wie durch die direkte Injektion von LPS in Mäusen gezeigt wurde (Tough et al. 1997). Die TCR-unabhängig T-Zell-Aktivierung wurde bisher hauptsächlich bei CD8⁺ T-Zellen beobachtet. Dabei wurde die Beteiligung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und Zytokinen bei der Initiierung von Bystander-T-Zellen beschrieben (Whiteside et al. 2018b). Bezogen auf *A. fumigatus* konnte gezeigt werden, dass MHC I-restriktive CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen durch TLR3-Erkennung von Pilz-RNA durch dendritische Zellen mittels Kreuzpräsentation aktiviert werden. Angesichts der Tatsache, dass TLR3 auch auf CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird (Edwards et al. 2003), kann der Beitrag der direkten TLR3-Signalübertragung zur proliferativen Aktivität der CD8⁺ T-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Ein genetischer Defekt der TLR3-Expression war dabei mit einer erhöhten Anfälligkeit für Aspergillosen sowohl bei Mäusen als auch bei Patienten nach Stammzelltransplantation assoziiert (Carvalho et al. 2012). CD8⁺ T-Zellen differenzieren in Abhängigkeit der sie umgebenden Zytokine in Tc1-Zellen und Tc17-Zellen (CD8⁺ T-Zellen, die IL-17A sezernieren) (Kumaresan et al. 2018). In mehreren Studien wurde die Rolle von Tc1- und Tc17-Zellen beim Schutz des Menschen vor Pilzinfektionen hervorgehoben (Nanjappa et al. 2012a; Nanjappa et al. 2012b). Tc1-Zellen wirken indirekt, indem sie Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF sekretieren, um angeborene Immunzellen wie Neutrophile und Makrophagen zu aktivieren, die an der antimykotischen Abwehr beteiligt sind. Darüber hinaus töten Tc1-Zellen nicht responsive pilzinfizierte Makrophagen direkt ab, indem sie zytotoxische Faktoren wie Perforin, Granulysin und Granzym K sekretieren (Lin et al. 2005). CD8⁺ Tc17-Zellen sezernieren wie CD4⁺ Th17-Zellen IL-17A-Zytokine, um

Epithelzellen zu aktivieren (Schleimhautimmunität) und antimikrobielle Produkte wie Defensin zur Bekämpfung von Pilzinfektionen auszuschleiden. Über die Aktivierung von CD4⁺ Bystander-T-Zellen ist jedoch wenig bekannt. Im Hinblick auf infektiöse Erkrankungen wurden CD4⁺ Bystander-T-Zellen bisher etwa bei Infektionen mit *Leishmania donovani* (Polley et al. 2005) oder *Borrelia burgdorferi* (Whiteside et al. 2018a) beschrieben. Bemerkenswerterweise wurde im Rahmen dieser Studie eine massive Proliferation der T-bet⁺ Th1-Zellen, deren Anteil von durchschnittlich 30,18 % aller CD4⁺ T-Zellen die Werte der CD154⁺ pilzreaktiven Th-Zellen (durchschnittlich 0,086 %) deutlich übersteigt, sowie ein signifikanter Anstieg der Expression des porzinen Aktivierungs- und Gedächtniszellmarkers CD8α der CD4⁺ T-Zellen 4 Tage nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition bei der Antigen-unspezifischen T-Zell-Analyse der immunkompetenten Schweine detektiert. Dieser Verlauf zeichnete sich zudem bei den temporär immunsupprimierten Tieren zeitverzögert ab. Es wurde beschrieben, dass neben Dectin-1 – dem am besten charakterisierten C-Typ-Lektin-Rezeptor – (Faro-Trindade et al. 2012) unter anderem auch die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) 2 und 4 an der Erkennung von *A. fumigatus* beteiligt sind. Interessanterweise wurde die unkonventionelle Expression von TLRs auch auf humanen T-Zellen beschrieben (Platzbecker et al. 2008). Studien an Mausmodellen haben gezeigt, dass CD4⁺ TLR2⁺ T-Zellen den Gedächtnis-Th1-Zellen phänotypisch ähnlich und in der Lage sind, IFN-γ unabhängig von der TCR-Aktivierung zu produzieren (Sobek et al. 2004; Imanishi et al. 2007). Anhand bisheriger Studien wurde jedoch beschrieben, dass TLR2 im Schwein hauptsächlich in Thymus, Milz, Peyer-Plaques des Ileums und Mesenteriallymphknoten exprimiert wird, jedoch nicht von peripheren Lymphozyten des Blutes (Tohno et al. 2006; Alvarez et al. 2008). Die Beantwortung der Frage, ob eine mögliche TLR-Expression der porzinen CD4⁺ T-Zellen oder auch ein individuelles Zytokinmilieu zur T-Zell-Rezeptor-unabhängigen Aktivierung der T-Helferzellen im Schwein nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition geführt hat, bedarf weiterer Untersuchungen. Da jedoch Läuferschweine aus konventioneller Tierhaltung eingesetzt wurden, muss zudem – trotz verabreichter Antibiose – auch die Infektion mit einem unbekanntem Erreger in Betracht gezogen werden (Pomorska-Mol und Markowska-Daniel 2011; Muirhead et al. 2013; Gerner et al. 2015).

5.6. Potenzial des Schweines als translationales Tiermodell zur Erforschung *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen

Aufgrund der Ähnlichkeiten bezüglich Anatomie, Genetik und Physiologie stellt das Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) ein geeignetes translationales Tiermodell zur Erforschung humaner Infektionserkrankungen dar (Meurens et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit konnten wesentliche Voraussetzungen für den Einsatz des Schweines in der

Erforschung *Aspergillus*-assoziierter Erkrankungen – insbesondere für die Analyse der adaptiven antimykotischen T-Helferzellantwort gegenüber *Aspergillus fumigatus* – geschaffen werden: a) unter Verwendung eines kreuzreaktiven humanen CD154-Antikörpers (Klon 5C8) gelang die Detektion *A. fumigatus*-reaktiver T-Helferzellen im Blut gesunder Schweine aus konventioneller Tierhaltung in ähnlicher Frequenz, Phänotyp und Differenzierungsstatus wie bei gesunden Menschen beschrieben sowie deren Detektion lokal im Lungengewebe; b) die Anwendung einer Methode, welche das sog. „CD154 surface trapping“ (Cohen, Kaur et al. 2005), eine chemische Stabilisierung mittels Monensin (Chattopadhyay, Yu et al. 2006) sowie die magnetische Anreicherung (Bacher et al. 2013) der CD154⁺ Th-Zellen kombiniert, ermöglichte die quantitative sowie phänotypische Analyse der *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellantworten im Schwein; c) infolge einer experimentellen Exposition gegenüber einer definierten Konzentration an luftgetragenen *Aspergillus*-Konidien innerhalb einer Aerosolkammer konnte in Verlaufsuntersuchungen die akute pilzspezifische Th-Zellantwort im Blut sowie eine Akkumulation von *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen lokal im Lungengewebe detektiert werden; d) durch die schrittweise Anpassung einer immunsuppressiven Medikation an das Schwein und deren Verabreichung über einen definierten Zeitraum vor der experimentellen *Aspergillus*-Exposition konnte der drastische Einfluss einer temporären Immunmodulation insbesondere auf die pulmonale *Aspergillus*-spezifische T-Zellantwort dargestellt werden; e) die Detektion *A. fumigatus*-reaktiver Th17-Zellen in der Lunge experimentell exponierter Schweine, welche zudem reaktiv gegenüber *C. albicans*-Antigenen sind, stellt eine wesentliche Voraussetzung zur Analyse des Einflusses von Kreuzreaktivitäten auf die pilzspezifische T-Zellantwort im porcinen Tiermodell dar. Insbesondere im Hinblick auf die vergleichbare strukturelle Anatomie der Lunge und der Anordnung des lymphatischen Gewebes des Atemtraktes sowie der Verfügbarkeit größerer Gewebemengen definierter Lokalisationen können im porcinen Tiermodell weitere Aspekte der pulmonalen pilzspezifischen T-Zellantwort adressiert werden, etwa a) welche Chemokinrezeptoren die Lungenmigration der CD154⁺ *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen bedingen und über welchen Zeitraum diese Migration stattfindet; b) inwieweit bereits vorhandene *A. fumigatus*-reaktive Th-Zellen lokal in der Lunge expandieren und wiederum in den peripheren Blutkreislauf auswandern; c) welche weiteren immunmodulatorischen Einflüsse die lokale adaptive Pilzabwehr im Schwein beeinflussen können oder d) ob lokale Unterschiede der Ausprägung der *Aspergillus*-spezifischen Th-Zellantwort in definierten Arealen der Lunge bestehen.

Das Immunsystem des Schweines wurde in den vergangenen Jahren genau charakterisiert und bietet bereits eine breite Palette etablierter Methoden und Werkzeuge für immunologische Fragestellungen (Meurens et al. 2012; Saalmüller und Gerner 2016). Trotz der Bemühungen, die immunologische Toolbox des Schweines stetig zu erweitern, ist die Sammlung von monoklonalen Antikörpern für die durchflusszytometrische Phänotypisierung von porcinen

Immunzellen im Vergleich zu Menschen und Mäusen jedoch noch unvollständig. Für einige CD-Antigene existieren derzeit keine verfügbaren monoklonalen Antikörper für das Schwein, wie zum Beispiel: mAb für CD19 auf B-Zellen, Reagenzien zur Charakterisierung von angeborenen lymphoiden Zellen, polarisierten Makrophagen, regulatorischen T-Zellen sowie zum Nachweis der verschiedenen CD45-Isoformen des Schweines (Dawson und Lunney 2018). Zudem fehlen für einige Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren die benötigten Reagenzien (Dawson et al. 2020). Mit den derzeit verfügbaren Tools konnte die SLAI-TCR-Wechselwirkung und folglich TCR-abhängige CD154-Expression auf CD4⁺ T-Zellen im Schwein bisher nicht direkt nachgewiesen werden, wie in Studien an Mäusen und Menschen bereits gezeigt wurde (Kirchhoff et al. 2007; Bacher et al. 2016). Der direkte Nachweis der MHC-Restriktion der CD154-Expression auf CD4⁺ T-Zellen im Schwein sollte daher in zukünftigen Studien adressiert werden. Anhand der Untersuchung expandierter porziner CD4⁺ T-Zellen konnte zudem – im Gegensatz zu Studien in Mensch (Chattopadhyay et al. 2006) und Maus (Koguchi et al. 2007) – nicht gezeigt werden, dass die CD154-Expression der T-Helferzellen im Schwein etwa 6 Stunden nach deren Stimulation mit Antigen ihren Höhepunkt erreicht. Es sollte daher beachtet werden, dass die Dauer der Restimulation sowie Antigenkonzentration sorgfältig an jeden Erreger, jedes Infektionsstadium oder jede Probenhandhabung angepasst werden müssen (Ebner et al. 2017). Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines schweinespezifischen oder kreuzreaktiven CD40-blockierenden Antikörpers zur Verhinderung der CD154-Internalisierung ist es derzeit nicht möglich, dass im Menschen etablierte Verfahren der Antigen-spezifischen T-Zell-Anreicherung (ARTE) (Bacher and Scheffold 2013, Bacher, Schink et al. 2013) äquivalent auf das Schwein zu übertragen. Die direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse nach Anwendung des sog. „CD154 surface trapping“ (Cohen et al. 2005) und chemischer Stabilisierung mittels Monensin (Chattopadhyay et al. 2006) gefolgt von magnetischer Anreicherung der porzinen CD154⁺ Th-Zellen mit den Resultaten humaner Studien ist daher nur eingeschränkt möglich. Des Weiteren wurde der im Menschen zu Anreicherung Antigen-spezifischer regulatorische Th-Zellen genutzte Aktivierungsmarker CD137 (4-1BB) (Bacher et al. 2016) im Schwein bisher lediglich zur Analyse Virus-spezifischer CD8 β ⁺ T-Zellen angewandt (Subramaniam et al. 2018). In Studien an gesunden Menschen konnte gezeigt werden, dass die *A. fumigatus*-spezifische Gedächtnis-T-Zell-Antwort durch hochaffine, klonal expandierte regulatorische T-Zellen dominiert wird (Bacher et al. 2014a; Bacher et al. 2016). Diese Daten legen nahe, dass *A. fumigatus* bei gesunden Menschen eher als Tolerogen agiert, ähnlich wie Pflanzenpollen oder Hausstaubmilben, und folglich regulatorische T-Zellen erforderlich sind, um die Toleranz gegenüber der ständigen Exposition mit Pilzantigenen aufrechtzuerhalten. Bei Patienten mit beeinträchtigten Lungenfunktionen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder Mukoviszidose stellen in der Tat Überempfindlichkeitsreaktionen und die allergische

bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) die häufigsten klinischen Komplikationen dar (Scheffold et al. 2018). Interessanterweise konnte in Humanstudien gezeigt werden, dass die regulatorische T-Zell-Antworten bei Patienten mit Mukoviszidose, die gegen *A. fumigatus* allergisch sind, nicht beeinträchtigt sind. Allerdings entwickeln sich deren pilzspezifische Th2-Zellen nur gegen Proteine, die nicht durch Antigen-reaktive regulatorische T-Zellen geschützt sind. Diese Daten weisen somit darauf hin, dass der „Antigen-Escape“ der Th2-Effektorzellen aus der Treg-vermittelten Toleranz ein wichtiger Mechanismus für die Entwicklung von Allergien ist (Bacher et al. 2016). Das porcine Mukoviszidose-Modell zeigt die meisten Manifestationen dieser Erkrankung im Menschen bei einer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des orthologen CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Gens im Schwein von 93 % verglichen mit dem humanen CFTR-Gen, dessen Mutation für die Ausprägung der Mukoviszidose verantwortlich ist (Semaniakou et al. 2019). Der Einsatz eines porcinen Mukoviszidose-Modells in der *Aspergillus*-Forschung ermöglicht nach Etablierung eines entsprechenden Markers zur Anreicherung Antigen-spezifischer regulatorischer Th-Zellen im Schwein die eingehende Analyse der regulatorischen T-Zell-Antwort gegenüber inhalierten *A. fumigatus*-Konidien, etwa deren Ausprägung im Vergleich zu gesunden Individuen nach definierten Antigen-Dosen, deren Spezifität und letztlich Beitrag zur Protektion vor *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen in der vorgeschädigten Lunge.

Das Schwein als translationales Infektionsmodell ermöglicht zudem die Betrachtung weiterer prädisponierender Faktoren von *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen wie etwa der im Zusammenhang mit Aspergillosen beschriebenen Influenza-Infektion (Van De Veerdonk et al. 2017b; Schauwvlieghe et al. 2018). *Aspergillus*-Koinfektionen wurden in den vergangenen Jahren vermehrt als Komplikation einer schweren Influenza-Infektion beobachtet und als ausschlaggebende Ursache für eine erhöhte Mortalitätsrate bei kritisch an Influenza erkrankten Patienten beschrieben (Ku et al. 2017; Duan et al. 2021). Die Mortalitätsrate der Influenza-assoziierten Aspergillose, über die in systematischen Übersichtsarbeiten berichtet wurde, schwankte zwischen 40 und 60 %, was zudem viel höher als die Sterblichkeitsrate schwer erkrankter Influenza-Patienten mit anderen oder ohne Koinfektionen angesehen wurde (Ku et al. 2017; Schauwvlieghe et al. 2018; Vanderbeke et al. 2018; Huang et al. 2019). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass reduzierte CD4⁺ T-Zell-Zahlen bei einer Influenza-Infektion mit einer höheren Inzidenz an *Aspergillus*-Koinfektionen sowie einer schlechteren Prognose der IPA assoziiert waren (Crum-Cianflone 2016; Ku et al. 2017; Schauwvlieghe et al. 2018; Huang et al. 2019). Schweine sind natürliche Wirte für Influenza-A-Virus-Infektionen, wobei die Subtypen H1N1 und H3N2 sowohl bei Mensch als auch Schwein endemisch vorkommen (Talker et al. 2016; Starbaek et al. 2018). Die Verteilung der Rezeptoren für Influenza-A-Viren in den porcinen Atemwegen entspricht derer des Menschen. So bilden Schweine nach der Influenza-Infektion eine klinische Erkrankung aus, welche die

Symptome von erkrankten Patienten widerspiegelt. Auch die Immunantwort ist dabei bemerkenswert ähnlich ausgeprägt wie im Menschen (Rajao und Vincent 2015; Starbaek et al. 2018). Während in humanen Studien bereits gezeigt werden konnte, dass CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei Patienten mit H3N2- und H1N1-Viren mit geringer ausgeprägten Symptomen sowie der reduzierten Virausscheidung assoziiert waren (Wilkinson et al. 2012), konnte auch bei Schweinen Influenza-spezifische IFN- γ -produzierende CD4⁺ T-Zellen bereits 4 Tage nach H1N2-Infektion in der Lunge nachgewiesen werden (Talker et al. 2016). Im Vergleich zum PRRS-Virus und des Schweine-Circovirus Typ 2 erzeugen zudem nur Influenza-A-Viren (H1N1) einen signifikanten Anstieg der CD4⁺ und CD4⁺CD8⁺ T-Zellen in der BAL infizierter Tiere, was auf eine Rolle dieser Population auch im Schwein während der Influenza-Infektion hinweist (Sinkora et al. 2014). Dahingegen ist bei Mäusen, vermutlich aufgrund des Fehlens menschlicher Influenza-Virus-Rezeptoren in den murinen Atemwegen (Ibricevic et al. 2006), eine Anpassung der humanen Viren erforderlich, um eine nachweisbare klinische Erkrankung hervorzurufen (Thangavel und Bouvier 2014). An die Maus angepasste Viren werden typischerweise in letalen Dosen eingesetzt und führen zu schweren Erkrankungen mit Lethargie und Anorexie und folglich zu Gewichtsverlust und Tod. Zudem findet zwischen den Mäusen keine Übertragung des Influenza-Virus statt (Rajao und Vincent 2015). Aufgrund der genannten Aspekte ist das Schwein als translationales Infektionsmodell für Influenza-*Aspergillus*-Koinfektionen der Maus in vielerlei Hinsicht überlegen.

Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* treten neben dem Menschen bei einer Vielzahl von Tierarten auf – darunter Vögel, Kühe, Pferde, Katzen und Hunde (Seyedmousavi et al. 2015; Elad und Segal 2018). Bei Hunden ist die sino-nasale Aspergillose (SNA) die häufigste Form einer *Aspergillus*-Infektion (Ballber et al. 2018). Der Pilz kann sich über einen Zeitraum von Monaten im caninen Wirt befinden, bevor klinische Symptome auftreten – darunter Niesen, schleimiger Nasenausfluss, Depigmentierung des Nasenspiegels, Epistaxis bis hin zur Zerstörung der Nasenmuscheln (Elad und Segal 2018; Valdes et al. 2018). Dabei ist auch die sinonasale Aspergillose des Hundes mit der Hochregulation Th1-assoziiierter Zytokine, IL-8 und TNF- α , assoziiert (Peeters et al. 2006; Peeters et al. 2007; Vanherberghen et al. 2012). Zudem wird angenommen, dass während der SNA experimentiertes IL-10 in einer gedämpften Th1-Reaktion resultiert, was eine übermäßige Gewebeschädigung verhindern würde. Darüber hinaus kann die Dämpfung der Th1-Reaktion jedoch zu einem chronischen Zustand der Infektion beitragen (Valdes et al. 2020). Das Schwein als translationales Tiermodell ermöglicht nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition in einer Aerosolkammer auch die eingehende Analyse der lokalen sino-nasalen T-Zellantwort gegenüber luftgetragenen Pilzsporen. Die Tatsache, dass der humane CD154-Antikörper (Klon 5C8) auch mit Lymphozyten des Hundes kreuzreagiert (Jochum et al. 2007; Jochum et al. 2008), eröffnet zudem die Möglichkeit der Übertragung der etablierten Methoden der Antigen-spezifischen T-Zellanalyse anhand der

CD154-Expression auf die Erforschung der T-Zellantwort gegenüber *A. fumigatus* von an SNA erkrankten Hunden.

Neben der Identifizierung und Charakterisierung pilzspezifischer T-Zellen zu diagnostischen Zwecken von *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen (Scheffold et al. 2018) ist auch deren Einsatz als neuartige antimykotische Therapie etwa für Empfänger von hämatopoetischen Stammzelltransplantaten (Papadopoulou et al. 2016) denkbar. Es existieren bereits zahlreiche Ansätze GMP (Good Manufacturing Practice) -konformer Methoden zur Ex-vivo-Expansion oder Bioverfahrenstechniken zur Erzeugung *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen für mögliche Immuntherapien (Ramadan et al. 2004; Perruccio et al. 2005; Beck et al. 2006; Zhu et al. 2008; Tramsen et al. 2009; Khanna et al. 2011; Gaundar et al. 2012; Kumaresan et al. 2014; Bacher et al. 2015a; Stuehler et al. 2015; Papadopoulou et al. 2019). In der derzeit einzigen klinische Studie zur adoptiven Immuntherapie bei der IA im Menschen konnte gezeigt werden, dass *Aspergillus*-Infektionen nach haploidentischer Stammzelltransplantation bei Patienten, die CD4⁺ *Aspergillus*-spezifische T-Zellklone erhielten, häufiger geheilt wurden als bei solchen ohne T-Zelltransfer (Perruccio et al. 2005). Auch der Einsatz von chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen, sog. CAR-T-Zellen, zur Bekämpfung akuter Pilzinfektionen wird diskutiert (Seif et al. 2019). Ein chimärer Antigenrezeptor mit der extrazelluläre Domäne von Dectin-1 – ein C-Typ-Lektinrezeptor spezifisch für β -Glucan auf der Pilzoberfläche – als Zielelement wurde entwickelt, um auf *Aspergillus fumigatus* abzielen. Die sog. D-CAR-T-Zellen wurden durch β -Glucan aktiviert, sekretierten anschließend IFN- γ und induzierten in vitro eine Hyphenschädigung. In einem immunkomprimierten Mausmodell für invasive Aspergillose konnte zudem gezeigt werden, dass die verabreichten D-CAR-T-Zellen die Pilzlast der infizierten Tiere reduzieren (Kumaresan et al. 2014). Der Einsatz *Aspergillus*-spezifischer CD4⁺ T-Zellen oder auch CAR-T-Zellen als adoptive Immuntherapie in der zukünftigen Behandlung invasiver Aspergillosen bedarf allerdings weiterer Forschung. Die Erprobung etwaiger protektiver bzw. therapeutischer Verfahren ist insbesondere vor der Durchführung klinischer Studien zunächst im Schwein als humanrelevantes Großtiermodell denkbar, welches aufgrund der einfachen Durchführung wiederholter Blutentnahmen auch Verlaufsstudien über einen längeren Zeitraum ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals die Detektion sowie phänotypische Charakterisierung *A. fumigatus*-reaktiver T-Helferzellen in gesunden Schweinen aus konventioneller Tierhaltung sowie nach experimenteller *Aspergillus*-Exposition in einer neuartigen Aerosolkammer sowohl gesunder als auch temporär immunsupprimierter Schweine. Die Ergebnisse unterstreichen das Potenzial des Hausschweines als translationales Großtiermodell zur Erforschung der antimykotischen T-Helferzellantwort sowie des möglichen Einsatzes der pilzspezifischen CD4⁺ T-Zellen zur Diagnose, Prävention oder Therapie *Aspergillus fumigatus*-assoziiierter Erkrankungen in Human- und Veterinärmedizin.

6. Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) verursacht schwere invasive Infektionen oder auch Überempfindlichkeitsreaktionen bei immungeschwächten Menschen sowie Patienten, die an bereits bestehenden Lungenerkrankungen leiden. Die rechtzeitige Diagnose invasiver Pilzinfektionen ist nach wie vor schwierig, da spezifische und hochempfindliche nicht-invasive Methoden für *A. fumigatus* fehlen. Die Betrachtung der T-Helferzellantwort (CD4⁺) gegen spezifische Pilzpathogene kann dabei wichtige Informationen über den Wirt-Pathogen-Status liefern und diagnostisch für die Kategorisierung von Patientengruppen genutzt werden. Die Untersuchung der Rolle von *Aspergillus*-spezifischen Th-Zellen für die antimykotische Immunität des Menschen ist jedoch bei gefährdeten Patienten aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten zur Probenahme sowie des schnellen Fortschreitens der Erkrankung äußerst schwierig. In dieser Studie wurde das Hausschwein als translationales Großtiermodell ausgewählt, um die antimykotische T-Zell-Immunität gegenüber luftgetragenen *A. fumigatus*-Sporen unter Anwendung des Aktivierungsmarkers CD154 und der Anreicherung porciner *Aspergillus*-spezifischer T-Helferzellen zu untersuchen. Der Pool von *A. fumigatus*-reaktiven CD4⁺ T-Zellen im Blut gesunder, natürlich exponierter Schweine war bezüglich des Differenzierungsstatus, der Frequenz und des Th1-Phänotyps mit Daten gesunder Menschen vergleichbar. Gesunde Schweine, die in einer Aerosolkammer experimentell einer definierten Konzentration von 10⁶ KBE/m³ Konidien über einen Zeitraum von 8 Stunden ausgesetzt waren, zeigten an Tag 4 nach der Exposition eine erhöhte Anzahl an *Aspergillus*-spezifischen Th-Zellen im Blut, gefolgt von einem Abfall und einem allmählichen Anstieg bis Tag 18. Nach der experimentellen Exposition akkumulierten *A. fumigatus*-reaktive CD4⁺ T-Zellen insbesondere in Lungengewebe und zeigten einen konsistenten Th1-Phänotyp. Experimentell exponierte Schweine entwickelten zudem keine klinischen Anzeichen einer Infektion. Eine temporäre medikamentös induzierte Immunsuppression vor der experimentellen *Aspergillus*-Exposition reduzierte die Anzahl der *A. fumigatus*-reaktiven Th-Zellen in Lungengewebe signifikant und resultierte in einer reduzierten Zytokinproduktion bis zu mehr als zwei Wochen nach Absetzen der supprimierenden Behandlung. Die initiale periphere *A. fumigatus*-reaktive T-Helferzellantwort im Blut war bemerkenswerterweise bei immunkompetenten sowie immunkompromittierten Schweinen sehr ähnlich. Darüber hinaus führte die experimentelle Exposition gegenüber *Aspergillus*-Konidien bereits nach 4 Tagen zu einem deutlichen Anstieg der pulmonalen Th17-Antwort mit Kreuzreaktivität gegenüber *C. albicans*. Die Ergebnisse unterstreichen daher den sinnvollen Einsatz von Hausschweinen zur Erforschung der *A. fumigatus*-reaktiven T-Helferzellantwort und bieten neue Anhaltspunkte zur Analyse prädisponierender Faktoren für *Aspergillus*-assoziierte Erkrankungen und des Potenzials der T-Zell-basierten Diagnostik und Therapie in Human- und Veterinärmedizin.

7. Summary

The domestic pig as translational large animal model to study adaptive anti-fungal immune responses against airborne *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus (*A. fumigatus*) causes severe invasive infections or associated hyperinflammatory diseases in immunocompromised individuals and patients suffering from pre-existing pulmonary conditions. The timely diagnosis of invasive fungal infections remains difficult because specific and highly sensitive non-invasive methods for *A. fumigatus* are missing. The analysis of the T helper cell response (CD4⁺) against specific fungal pathogens can provide important information about the actual fungus-host interaction status and can be used diagnostically for the categorization of patient groups. But studying the role of *Aspergillus*-specific Th cells for human antifungal immunity is extremely difficult in patients at high risk due to sampling limitations and fast disease progression. Here, we exploit the domestic pig as human-relevant large animal model to investigate the anti-fungal T cell response against airborne *A. fumigatus* using the activation marker CD154 and enrichment of porcine *Aspergillus*-specific T helper cells. The pool of *A. fumigatus*-specific T cells in blood of healthy, naturally exposed pigs, was similar in differentiation, frequency and Th1 phenotype compared to their human counterparts. Healthy pigs experimentally exposed to 10⁶ cfu/m³ conidia over a period of 8 hours in an aerosol chamber showed increased numbers of *Aspergillus*-specific T cells in blood by day 4 after exposure, followed by a drop and gradual increase until day 18. Following exposure, high numbers of *Aspergillus*-specific T cells accumulated specifically in lung tissues and presented a consistent Th1 phenotype. Experimentally exposed pigs did not develop clinical signs of infection. A brief, drug-induced immunosuppression before exposure significantly reduced the number of *Aspergillus*-specific T cells in lung tissues showing a decreased capacity to produce cytokines more than two weeks after discontinuing suppressive treatment. However, the initial blood response dynamics of *Aspergillus*-specific Th cells were similar between immunocompetent and -compromised pigs. Moreover, high doses of inhaled conidia led to a particularly strong increase of pulmonary Th17 responses already at day 4 post exposure with cross-reactivity to *C. albicans*. Thus, these data highlight the use of domestic pigs for addressing *Aspergillus*-specific T cell immunity and provide new opportunities for studying predisposing factors for infections with *A. fumigatus* and the potential of T cell-based diagnostic and therapy in human and veterinary medicine.

Literaturverzeichnis

Abdo, W., T. Kawachi, H. Sakai, H. Fukushi, R. Kano, T. Shibahara, H. Shirouzu, Y. Kakizoe, H. Tuji and T. Yanai (2012):

Disseminated mycosis in a killer whale (*Orcinus orca*).

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **24**: 211-218. DOI: 10.1177/1040638711416969.

Agarwal, R., A. Chakrabarti, A. Shah, D. Gupta, J. F. Meis, R. Guleria, R. Moss, D. W. Denning and A. C. A. ISHAM (2013a):

Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria.

Clinical and Experimental Allergy **43**: 850-873. DOI: 10.1111/cea.12141.

Agarwal, R., G. Vishwanath, A. N. Aggarwal, M. Garg, D. Gupta and A. Chakrabarti (2013b):
Itraconazole in chronic cavitary pulmonary aspergillosis: a randomised controlled trial and systematic review of literature.

Mycoses **56**: 559-570. DOI: 10.1111/myc.12075.

Akan, M., R. Haziroglu, Z. Ilhan, B. Sareyyupoglu and R. Tunca (2002):

A case of aspergillosis in a broiler breeder flock.

Avian Diseases **46**: 497-501. DOI: Doi 10.1637/0005-2086(2002)046[0497:Acoai]2.0.Co;2.

Alangaden, G. J., M. Wahiduzzaman, P. H. Chandrasekar and B. M. T. Grp (2002):

Aspergillosis: The most common community-acquired pneumonia with gram-negative bacilli as copathogens in stem cell transplant recipients with graft-versus-host disease.

Clinical Infectious Diseases **35**: 659-664. DOI: Doi 10.1086/342061.

Alastruey-Izquierdo, A., J. Cadranel, H. Flick, C. Godet, C. Hennequin, M. Hoenigl, C. Kosmidis, C. Lange, O. Munteanu, I. Page, H. J. F. Salzer and C. on behalf of (2018):

Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Current Standards and Future Perspectives.

Respiration **96**: 159-170. DOI: 10.1159/000489474.

Alvarez, B., C. Revilla, N. Domenech, C. Perez, P. Martinez, F. Alonso, A. Ezquerria and J. Domiguez (2008):

Expression of toll-like receptor 2 (TLR2) in porcine leukocyte subsets and tissues.

Veterinary Research **39**. DOI: ARTN 13
10.1051/vetres:2007051.

Arne, P., S. Thierry, D. Wang, M. Deville, G. Le Loc'h, A. Desoutter, F. Femenia, A. Nieguitsila, W. Huang, R. Chermette and J. Guillot (2011):

Aspergillus fumigatus in Poultry.

Int J Microbiol **2011**: 746356. DOI: 10.1155/2011/746356.

Asfaha, S., A. N. Dubeykovskiy, H. Tomita, X. D. Yang, S. Stokes, W. Shibata, R. A. Friedman, H. Ariyama, Z. A. Dubeykovskaya, S. Muthupalani, R. Ericksen, H. Frucht, J. G. Fox and T. C. Wang (2013):

Mice That Express Human Interleukin-8 Have Increased Mobilization of Immature Myeloid Cells, Which Exacerbates Inflammation and Accelerates Colon Carcinogenesis.

Gastroenterology **144**: 155-166. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.09.057.

Atasever, A. and K. S. Gumussoy (2004):

Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings.

Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine **51**: 19-22. DOI: DOI 10.1111/j.1439-0442.2004.00598.x.

Azie, N., D. Neofytos, M. Pfaller, H. U. Meier-Kriesche, S. P. Quan and D. Horn (2012):

The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance (R) registry and invasive fungal infections: update 2012.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **73**: 293-300. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.012.

Bacher, P., F. Heinrich, U. Stervbo, M. Nienen, M. Vahldieck, C. Iwert, K. Vogt, J. Kollet, N. Babel, B. Sawitzki, C. Schwarz, S. Bereswill, M. M. Heimesaat, G. Heine, G. Gadermaier, C. Asam, M. Assenmacher, O. Kniemeyer, A. A. Brakhage, F. Ferreira, M. Wallner, M. Worm and A. Scheffold (2016):

Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans.

Cell **167**: 1067-1078 e1016. DOI: 10.1016/j.cell.2016.09.050.

Bacher, P., T. Hohnstein, E. Beerbaum, M. Rocker, M. G. Blango, S. Kaufmann, J. Rohmel, P. Eschenhagen, C. Grehn, K. Seidel, V. Rickerts, L. Lozza, U. Stervbo, M. Nienen, N. Babel, J. Milleck, M. Assenmacher, O. A. Cornely, M. Ziegler, H. Wisplinghoff, G. Heine, M. Worm, B. Siegmund, J. Maul, P. Creutz, C. Tabeling, C. Ruwwe-Glosenkamp, L. E. Sander, C. Knosalla, S. Brunke, B. Hube, O. Kniemeyer, A. A. Brakhage, C. Schwarz and A. Scheffold (2019):

Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*.

Cell **176**: 1340-1355 e1315. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.041.

Bacher, P., A. Jochheim-Richter, N. Mockel-Tenbrink, O. Kniemeyer, E. Wingenfeld, R. Alex, A. Ortigao, D. Karpova, T. Lehrnbecher, A. J. Ullmann, A. Hamprecht, O. Cornely, A. A. Brakhage, M. Assenmacher, H. Bonig and A. Scheffold (2015a):

Clinical-scale isolation of the total *Aspergillus fumigatus*-reactive T-helper cell repertoire for adoptive transfer.

Cytotherapy **17**: 1396-1405. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.05.011.

Bacher, P., O. Kniemeyer, A. Schonbrunn, B. Sawitzki, M. Assenmacher, E. Rietschel, A. Steinbach, O. A. Cornely, A. A. Brakhage, A. Thiel and A. Scheffold (2014a):

Antigen-specific expansion of human regulatory T cells as a major tolerance mechanism against mucosal fungi.

Mucosal Immunol **7**: 916-928. DOI: 10.1038/mi.2013.107.

Bacher, P., O. Kniemeyer, J. Teutschbein, M. Thon, M. Vodisch, D. Wartenberg, D. H. Scharf, N. Koester-Eiserfunke, M. Schutte, S. Dubel, M. Assenmacher, A. A. Brakhage and A. Scheffold (2014b):

Identification of immunogenic antigens from *Aspergillus fumigatus* by direct multiparameter characterization of specific conventional and regulatory CD4+ T cells.

J Immunol **193**: 3332-3343. DOI: 10.4049/jimmunol.1400776.

Bacher, P. and A. Scheffold (2013):

Flow-Cytometric Analysis of Rare Antigen-Specific T Cells.

Cytometry Part A **83a**: 692-701. DOI: 10.1002/cyto.22317.

Bacher, P. and A. Scheffold (2015):

New technologies for monitoring human antigen-specific T cells and regulatory T cells by flow-cytometry.

Curr Opin Pharmacol **23**: 17-24. DOI: 10.1016/j.coph.2015.04.005.

Bacher, P., C. Schink, J. Teutschbein, O. Kniemeyer, M. Assenmacher, A. A. Brakhage and A. Scheffold (2013):

Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire.

J Immunol **190**: 3967-3976. DOI: 10.4049/jimmunol.1202221.

Bacher, P., A. Steinbach, O. Kniemeyer, A. Hamprecht, M. Assenmacher, M. J. Vehreschild, J. J. Vehreschild, A. A. Brakhage, O. A. Cornely and A. Scheffold (2015b):

Fungus-specific CD4(+) T cells for rapid identification of invasive pulmonary mold infection.

Am J Respir Crit Care Med **191**: 348-352. DOI: 10.1164/rccm.201407-1235LE.

Bae, S., H. J. Hwang, M. Y. Kim, M. J. Kim, Y. P. Chong, S. O. Lee, S. H. Choi, Y. S. Kim, J. H. Woo and S. H. Kim (2019):

Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome.

Clin Infect Dis. DOI: 10.1093/cid/ciz673.

Ballber, C., T. L. Hill and N. X. Bommer (2018):

Minimally invasive treatment of sino-nasal aspergillosis in dogs.

Journal of Veterinary Internal Medicine **32**: 2069-2073. DOI: 10.1111/jvim.15311.

Balloy, V., J. M. Sallenave, Y. Z. Wu, L. Touqui, J. P. Latge, M. Si-Tahar and M. Chignard (2008):

Aspergillus fumigatus-induced Interleukin-8 Synthesis by Respiratory Epithelial Cells Is Controlled by the Phosphatidylinositol 3-Kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 Pathways and Not by the Toll-like Receptor-MyD88 Pathway.

Journal of Biological Chemistry **283**: 30513-30521. DOI: 10.1074/jbc.M803149200.

Bao, L., C. Hao, J. Wang, D. Wang, Y. Zhao, Y. Li and W. Yao (2020):

High-Dose Cyclophosphamide Administration Orchestrates Phenotypic and Functional Alterations of Immature Dendritic Cells and Regulates Th Cell Polarization.

Front Pharmacol **11**: 775. DOI: 10.3389/fphar.2020.00775.

Barley, J., G. Foster, B. Reid, M. Dagleish and F. Howie (2007):

Encephalitis in a northern bottlenose whale.

Vet Rec **160**: 452. DOI: 10.1136/vr.160.13.452-a.

Barrs, V. R., C. Halliday, P. Martin, B. Wilson, M. Krockenberger, M. Gunew, S. Bennett, E. Koehlmeyer, A. Thompson, R. Fliegner, A. Hocking, S. Sleiman, C. O'Brien and J. A. Beatty (2012):

Sinonasal and sino-orbital aspergillosis in 23 cats: Aetiology, clinicopathological features and treatment outcomes.

Veterinary Journal **191**: 58-64. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.02.009.

Barrs, V. R., T. M. van Doorn, J. Houbraken, S. E. Kidd, P. Martin, M. D. Pinheiro, M. Richardson, J. Varga and R. A. Samson (2013):

Aspergillus felis sp nov., an Emerging Agent of Invasive Aspergillosis in Humans, Cats, and Dogs.

Plos One **8**. DOI: ARTN e64871
10.1371/journal.pone.0064871.

Bazaz, R. and D. W. Denning (2018):

Subacute Invasive Aspergillosis Associated With Sorafenib Therapy for Hepatocellular Carcinoma.

Clin Infect Dis **67**: 156-157. DOI: 10.1093/cid/ciy038.

Beaussart, A., S. El-Kirat-Chatel, T. Fontaine, J. P. Latge and Y. F. Dufrene (2015):

Nanoscale biophysical properties of the cell surface galactosaminogalactan from the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*.

Nanoscale **7**: 14996-15004. DOI: 10.1039/c5nr04399a.

Beauvais, A., S. Bozza, O. Kniemeyer, C. Formosa, V. Balloy, C. Henry, R. W. Roberson, E. Dague, M. Chignard, A. A. Brakhage, L. Romani and J. P. Latge (2013):

Deletion of the alpha-(1,3)-Glucan Synthase Genes Induces a Restructuring of the Conidial Cell Wall Responsible for the Avirulence of *Aspergillus fumigatus*.

Plos Pathogens **9**. DOI: ARTN e1003716
10.1371/journal.ppat.1003716.

Beauvais, A. and J. P. Latge (2015):

Aspergillus Biofilm In Vitro and In Vivo.

Microbiology Spectrum **3**. DOI: UNSP MB-0017-2015

10.1128/microbiolspec.MB-0017-2015.

Beauvais, A., C. Schmidt, S. Guadagnini, P. Roux, E. Perret, C. Henry, S. Paris, A. Mallet, M. C. Prevost and J. P. Latge (2007):

An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*.

Cellular Microbiology **9**: 1588-1600. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.00895.x.

Beck, O., U. Koehl, L. Tramsen, S. Mousset, J. P. Latge, K. Mueller, D. Schwabe, P. Bader, T. Klingebiel and T. Lehrnbecher (2008):

Enumeration of functionally active anti-*Aspergillus* T-cells in human peripheral blood.

Journal of Immunological Methods **335**: 41-45. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.014.

Beck, O., M. S. Topp, U. Koehl, E. Roilides, M. Simitopoulou, M. Hanisch, J. Sarfati, J. P. Latge, T. Klingebiel, H. Einsele and T. Lehrnbecher (2006):

Generation of highly purified and functionally active human TH1 cells against *Aspergillus fumigatus*.

Blood **107**: 2562-2569. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1660.

Becker, K. L., M. S. Gresnigt, S. P. Smeekens, C. W. Jacobs, C. Magis-Escurra, M. Jaeger, X. Wang, R. Lubbers, M. Oosting, L. A. B. Joosten, M. G. Netea, M. H. Reijers and F. L. van de Veerdonk (2015):

Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients.

Clinical and Experimental Allergy **45**: 423-437. DOI: 10.1111/cea.12354.

Bedke, T., R. G. Iannitti, A. De Luca, G. Giovannini, F. Fallarino, C. Berges, J. P. Latge, H. Einsele, L. Romani and M. S. Topp (2014):

Distinct and complementary roles for *Aspergillus fumigatus*-specific Tr1 and Foxp3(+) regulatory T cells in humans and mice.

Immunology and Cell Biology **92**: 659-670. DOI: 10.1038/icb.2014.34.

Beernaert, L. A., F. Pasmans, L. Van Waeyenberghe, F. Haesebrouck and A. Martel (2010):

Aspergillus infections in birds: a review.

Avian Pathology **39**: 325-331. DOI: Pii 928181606

10.1080/03079457.2010.506210.

Benjamim, C. F., S. K. Lundy, N. W. Lukacs, C. M. Hogaboam and S. L. Kunkel (2005):

Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells.

Blood **105**: 3588-3595. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3251.

Blickensdorf, M., S. Timme and M. T. Figge (2019):

Comparative Assessment of Aspergillosis by Virtual Infection Modeling in Murine and Human Lung.

Front Immunol **10**: 142. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00142.

Boch, T., B. Spiess, O. A. Cornely, J. J. Vehreschild, P. M. Rath, J. Steinmann, W. J. Heinz, J. Hahn, S. W. Krause, M. G. Kiehl, G. Egerer, T. Liebregts, M. Koldehoff, M. Klein, F. Nolte, M. C. Mueller, N. Merker, S. Will, M. Mossner, H. Popp, W. K. Hofmann, M. Reinwald and D. Buchheidt (2016):

Diagnosis of invasive fungal infections in haematological patients by combined use of galactomannan, 1,3-beta-D-glucan, *Aspergillus* PCR, multifungal DNA-microarray, and *Aspergillus* azole resistance PCRs in blood and bronchoalveolar lavage samples: results of a prospective multicentre study.

Clinical Microbiology and Infection **22**: 862-868. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.06.021.

Bordet, E., M. Fretaud, E. Crisci, E. Bouguyon, S. Rault, J. Pezant, A. Pleau, P. Renson, E. Giuffra, T. Larcher, M. Bourge, O. Bourry, O. Boulesteix, C. Langevin, I. Schwartz-Cornil and N. Bertho (2019):

Macrophage-B Cell Interactions in the Inverted Porcine Lymph Node and Their Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus.

Frontiers in Immunology **10**. DOI: ARTN 953
10.3389/fimmu.2019.00953.

Bouzani, M., M. Ok, A. McCormick, F. Ebel, O. Kurzai, C. O. Morton, H. Einsele and J. Loeffler (2011):

Human NK Cells Display Important Antifungal Activity against *Aspergillus fumigatus*, Which Is Directly Mediated by IFN-gamma Release.

Journal of Immunology **187**: 1369-1376. DOI: 10.4049/jimmunol.1003593.

Bozza, S., C. Clavaud, G. Giovannini, T. Fontaine, A. Beauvais, J. Sarfati, C. D'Angelo, K. Perruccio, P. Bonifazi, S. Zagarella, S. Moretti, F. Bistoni, J. P. Latge and L. Romani (2009):

Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination.

J Immunol **183**: 2407-2414. DOI: 10.4049/jimmunol.0900961.

Cao, D., Q. M. Cao, S. Subramaniam, D. M. Yugo, C. L. Heffron, A. J. Rogers, S. P. Kenney, D. Tian, S. R. Matzinger, C. Overend, N. Catanzaro, T. LeRoith, H. Wang, P. Pineyro, N. Lindstrom, S. Clark-Deener, L. Yuan and X. J. Meng (2017):

Pig model mimicking chronic hepatitis E virus infection in immunocompromised patients to assess immune correlates during chronicity.

Proc Natl Acad Sci U S A **114**: 6914-6923. DOI: 10.1073/pnas.1705446114.

Cao, Y., I. K. Bender, A. K. Konstantinidis, S. C. Shin, C. M. Jewell, J. A. Cidlowski, R. P. Schleimer and N. Z. Lu (2013):

Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans.

Blood **121**: 1553-1562. DOI: 10.1182/blood-2012-05-432336.

Carrasco, L., A. Mendez and H. E. Jensen (1996):

Chronic bronchopulmonary aspergillosis in a horse with Cushing's syndrome.

Mycoses **39**: 443-447. DOI: DOI 10.1111/j.1439-0507.1996.tb00094.x.

Carrion Sde, J., S. M. Leal, Jr., M. A. Ghannoum, V. Aimanianda, J. P. Latge and E. Pearlman (2013):

The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo.

J Immunol **191**: 2581-2588. DOI: 10.4049/jimmunol.1300748.

Carvalho, A., A. De Luca, S. Bozza, C. Cunha, C. D'Angelo, S. Moretti, K. Perruccio, R. G. Iannitti, F. Fallarino, A. Pierini, J. P. Latge, A. Velardi, F. Aversa and L. Romani (2012):

TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8(+) T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients.

Blood **119**: 967-977. DOI: 10.1182/blood-2011-06-362582.

Cenci, E., A. Mencacci, A. Bacci, F. Bistoni, V. P. Kurup and L. Romani (2000):

T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis.

J Immunol **165**: 381-388. DOI: 10.4049/jimmunol.165.1.381.

Chai, L. Y. A., M. G. Netea, J. Sugui, A. G. Vonk, W. W. J. van de Sande, A. Warris, K. J. Kwon-Chung and B. J. Kullberg (2010):

Aspergillus fumigatus Conidial Melanin Modulates Host Cytokine Response.

Immunobiology **215**: 915-920. DOI: 10.1016/j.imbio.2009.10.002.

Chan, Y. R., K. Chen, S. R. Duncan, K. L. Lathrop, J. D. Latoche, A. J. Logar, D. A. Pociask, B. J. Wahlberg, P. Ray, A. Ray, J. M. Pilewski and J. K. Kolls (2013):

Patients with cystic fibrosis have inducible IL-17(+)IL-22(+) memory cells in lung draining lymph nodes.

Journal of Allergy and Clinical Immunology **131**: 1117-+. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.05.036.

Chandenier, J., S. Bernard, J. Montharu, E. Bailly, F. Fetissov, M. de Monte, G. Desoubeaux, P. Diot and D. Richard-Lenoble (2009):

The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis.

Mycoses **52**: 239-245. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2009.01695.x.

Chattopadhyay, P. K., J. Yu and M. Roederer (2005):

A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles.

Nat Med **11**: 1113-1117. DOI: 10.1038/nm1293.

Chattopadhyay, P. K., J. Yu and M. Roederer (2006):

Live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T-cell responses by CD154 expression.

Nat Protoc **1**: 1-6. DOI: 10.1038/nprot.2006.1.

Chaudhary, N., J. F. Staab and K. A. Marr (2010):

Healthy human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* antigens.

PLoS One **5**: e9036. DOI: 10.1371/journal.pone.0009036.

Chen, T. Y., J. Guo, M. J. Yang, C. F. Han, M. H. Zhang, W. Chen, Q. Y. Liu, J. L. Wang and X. T. Cao (2004):

Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression.

Blood **103**: 413-421. DOI: 10.1182/blood-2003-07-2412.

Chen, X. C., Z. X. Yu, Y. J. Qian, D. J. Dong, Y. Y. Hao, N. Liu and Q. Gu (2018):

Clinical features of fatal severe fever with thrombocytopenia syndrome that is complicated by invasive pulmonary aspergillosis.

Journal of Infection and Chemotherapy **24**: 422-427. DOI: 10.1016/j.jiac.2018.01.005.

Choi, H. K., W. E. Finkbeiner and J. H. Widdicombe (2000):

A comparative study of mammalian tracheal mucous glands.

Journal of Anatomy **197**: 361-372. DOI: DOI 10.1046/j.1469-7580.2000.19730361.x.

Clemons, K. V. and D. A. Stevens (2005):

The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence.

Med Mycol **43** Suppl 1: S101-110. DOI: 10.1080/13693780500051919.

Cohen, G. B., A. Kaur and R. P. Johnson (2005):

Isolation of viable antigen-specific CD4 T cells by CD40L surface trapping.

J Immunol Methods **302**: 103-115. DOI: 10.1016/j.jim.2005.05.002.

Cohn, L. A. (2014):

Canine Nasal Disease.

Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice **44**: 75-+. DOI:

10.1016/j.cvsm.2013.08.002.

Cole, R. J., J. W. Kirksey, J. W. Dorner, D. M. Wilson, J. C. Johnson, A. N. Johnson, D. M. Bedell, J. P. Springer and K. K. Chexal (1977):

Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage.

Journal of Agricultural and Food Chemistry **25**: 826-830. DOI: 10.1021/jf60212a015.

Cornely, O. A., J. Maertens, M. Bresnik, R. Ebrahimi, E. Dellow, R. Herbrecht and J. P. Donnelly (2011):

Efficacy outcomes in a randomised trial of liposomal amphotericin B based on revised EORTC/MSG 2008 definitions of invasive mould disease.

Mycoses **54**: e449-455. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01947.x.

Cornet, M., L. Fleury, C. Maslo, J. F. Bernard, G. Brucker and A. P. H. Paris (2002):
Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area.

Journal of Hospital Infection **51**: 288-296. DOI: 10.1053/jhin.2002.1258.

Corona, C., G. Coizza, F. Martucci, G. D. Luca and E. J. A. d. S. I. d. P. e. A. d. S. Bozzetta (2004):

Pulmonary aspergillosis in a pig.

In: Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini 2004 Meeting Annuale, Salsomaggiore Terme, Italy. Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini.

S. 387-390

Crum-Cianflone, N. F. (2016):

Invasive Aspergillosis Associated With Severe Influenza Infections.

Open Forum Infectious Diseases **3**. DOI: 10.1093/ofid/ofw171.

Dagleish, M. P., G. Foster, F. E. Howie, R. J. Reid and J. Barley (2008):

Fatal mycotic encephalitis caused by *Aspergillus fumigatus* in a northern bottlenose whale (*Hyperoodon ampullatus*).

Vet Rec **163**: 602-604. DOI: 10.1136/vr.163.20.602.

Davis, E. W. and A. M. Legendre (1994):

Successful Treatment of Guttural Pouch Mycosis with Itraconazole and Topical Enilconazole in a Horse.

Journal of Veterinary Internal Medicine **8**: 304-305. DOI: DOI 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03239.x.

Dawson, H. D. (2012):

A Comparative Assessment of the Pig, Mouse and Human Genomes Structural and Functional Analysis of Genes Involved in Immunity and Inflammation.

Minipig in Biomedical Research: 323-342.

Dawson, H. D., C. A. Guidry, V. Vangimalla and J. F. Urban (2007):

The Beltsville human nutrition research center's porcine immunology and nutrition resource database.

Faseb Journal **21**: A377-A377.

Dawson, H. D. and J. K. Lunney (2018):

Porcine cluster of differentiation (CD) markers 2018 update.

Research in Veterinary Science **118**: 199-246. DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.02.007.

Dawson, H. D., Y. Sang and J. K. Lunney (2020):

Porcine cytokines, chemokines and growth factors: 2019 update.

Res Vet Sci **131**: 266-300. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.04.022.

De Luca, A., R. G. Iannitti, S. Bozza, R. Beau, A. Casagrande, C. D'Angelo, S. Moretti, C. Cunha, G. Giovannini, C. Massi-Benedetti, A. Carvalho, L. Boon, J. P. Latge and L. Romani (2012):

CD4(+) T cell vaccination overcomes defective cross-presentation of fungal antigens in a mouse model of chronic granulomatous disease.

J Clin Invest **122**: 1816-1831. DOI: 10.1172/JCI60862.

De Pauw, B., T. J. Walsh, J. P. Donnelly, D. A. Stevens, J. E. Edwards, T. Calandra, P. G. Pappas, J. Maertens, O. Lortholary, C. A. Kauffman, D. W. Denning, T. F. Patterson, G. Maschmeyer, J. Bille, W. E. Dismukes, R. Herbrecht, W. W. Hope, C. C. Kibbler, B. J. Kullberg, K. A. Marr, P. Munoz, F. C. Odds, J. R. Perfect, A. Restrepo, M. Ruhnke, B. H. Segal, J. D. Sobel, T. C. Sorrell, C. Viscoli, J. R. Wingard, T. Zaoutis and J. E. Bennett (2008):

Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group.

Clinical Infectious Diseases **46**: 1813-1821. DOI: 10.1086/588660.

Dean, S., D. Horley and B. Tuch (2003):

The immunosuppression of pigs: A review.

Transplantation Reviews **17**: 45-59. DOI: 10.1053/trre.2003.1.

Demuyser, T., E. De Cock and E. Sermijn (2019):

Airborne *Aspergillus fumigatus* contamination in an intensive care unit: Detection, management and control.

J Infect Public Health **12**: 904-906. DOI: 10.1016/j.jiph.2019.04.016.

Denning, D. W., J. Cadranet, C. Beigelman-Aubry, F. Ader, A. Chakrabarti, S. Blot, A. J. Ullmann, G. Dimopoulos, C. Lange, E. S. C. M. In and E. R. Soc (2016):

Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management.

European Respiratory Journal **47**: 45-68. DOI: 10.1183/13993003.00583-2015.

Desoubeaux, G. and J. Chandenier (2012):

A nebulized intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis.

Methods Mol Biol **845**: 511-518. DOI: 10.1007/978-1-61779-539-8_36.

Desoubeaux, G. and C. Cray (2017):

Rodent Models of Invasive Aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus*: Still a Long Path toward Standardization.

Frontiers in Microbiology **8**. DOI: ARTN 841
10.3389/fmicb.2017.00841.

Desoubeaux, G. and C. Cray (2018):
Animal Models of Aspergillosis.
Comparative Medicine **68**: 109-123.

Dewi, I. M. W., F. L. van de Veerdonk and M. S. Gresnigt (2017):
The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*.
J Fungi (Basel) **3**. DOI: 10.3390/jof3040055.

Dioverti, M. V., O. M. Abu Saleh and A. J. Tande (2018):
Infectious complications in patients on treatment with Ruxolitinib: case report and review of the literature.
Infectious Diseases **50**: 381-387. DOI: 10.1080/23744235.2017.1390248.

Duan, Y., X. Ou, Y. Chen, B. Liang and X. Ou (2021):
Severe Influenza With Invasive Pulmonary Aspergillosis in Immunocompetent Hosts: A Retrospective Cohort Study.
Front. Med. **7**: 602732. DOI: 10.3389/fmed.2020.602732.

Ebner, F., S. Rausch, L. Scharek-Tedin, R. Pieper, M. Burwinkel, J. Zentek and S. Hartmann (2014):
A novel lineage transcription factor based analysis reveals differences in T helper cell subpopulation development in infected and intrauterine growth restricted (IUGR) piglets.
Developmental and Comparative Immunology **46**: 333-340. DOI: 10.1016/j.dci.2014.05.005.

Ebner, F., P. Schwiertz, S. Steinfeldler, R. Pieper, J. Zentek, N. Schutze, C. G. Baums, G. Alber, P. Geldhof and S. Hartmann (2017):
Pathogen-Reactive T Helper Cell Analysis in the Pig.
Front Immunol **8**: 565. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00565.

Edwards, A. D., S. S. Diebold, E. M. C. Slack, H. Tomizawa, H. Hemmi, T. Kaisho, S. Akira and C. R. Sousa (2003):
Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha(+) DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines.
European Journal of Immunology **33**: 827-833. DOI: DOI 10.1002/eji.200323797.

Elad, D. and E. Segal (2018):
Diagnostic Aspects of Veterinary and Human Aspergillosis.
Frontiers in Microbiology **9**. DOI: ARTN 1303
10.3389/fmicb.2018.01303.

Elias, G., B. Ogunjimi and V. Van Tendeloo (2020):
Activation-induced surface proteins in the identification of antigen-responsive CD4 T cells.
Immunol Lett **219**: 1-7. DOI: 10.1016/j.imlet.2019.12.006.

Enosawa, S. and E. Kobayashi (2019):

Controllable Immunosuppression in Pigs as a Basis for Preclinical Studies on Human Cell Therapy.

Xenotransplantation - Comprehensive Study.

IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.89521

Espinosa, V., O. Dutta, C. McElrath, P. C. Du, Y. J. Chang, B. Cicciarelli, A. Pitler, I. Whitehead, J. J. Obar, J. E. Durbin, S. V. Kotenko and A. Rivera (2017):

Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity.

Science Immunology **2**. DOI: ARTN ean5357

10.1126/sciimmunol.aan5357.

Espinosa, V., A. Jhingran, O. Dutta, S. Kasahara, R. Donnelly, P. Du, J. Rosenfeld, I. Leiner, C. C. Chen, Y. Ron, T. M. Hohl and A. Rivera (2014):

Inflammatory monocytes orchestrate innate antifungal immunity in the lung.

PLoS Pathog **10**: e1003940. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003940.

Espinosa, V. and A. Rivera (2012):

Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation.

Cytokine **58**: 100-106. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.11.005.

Fairbairn, L., R. Kapetanovic, D. P. Sester and D. A. Hume (2011):

The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease.

Journal of Leukocyte Biology **89**: 855-871. DOI: 10.1189/jlb.1110607.

Faro-Trindade, I., J. A. Willment, A. M. Kerrigan, P. Redelinghuys, S. Hadebe, D. M. Reid, N. Srinivasan, H. Wainwright, D. M. Lang, C. Steele and G. D. Brown (2012):

Characterisation of Innate Fungal Recognition in the Lung.

Plos One **7**. DOI: ARTN e35675

10.1371/journal.pone.0035675.

Fedde, M. R. (1998):

Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility.

Poultry Science **77**: 1130-1138. DOI: DOI 10.1093/ps/77.8.1130.

Findik, S. (2011):

Tracheal bronchus in the adult population.

J Bronchology Interv Pulmonol **18**: 149-153. DOI: 10.1097/LBR.0b013e318216e30e.

Flaming, K. P., B. L. Goff, D. E. Frank and J. A. Roth (1994):

Pigs Are Relatively Resistant to Dexamethasone-Induced Immunosuppression.

Comparative Haematology International **4**: 218-225. DOI: Doi 10.1007/Bf00185177.

Freeman, D. E. (2015):

Update on Disorders and Treatment of the Guttural Pouch.

Veterinary Clinics of North America-Equine Practice **31**: 63-+. DOI: 10.1016/j.cveq.2014.11.010.

Frentsch, M., O. Arbach, D. Kirchhoff, B. Moewes, M. Worm, M. Rothe, A. Scheffold and A. Thiel (2005):

Direct access to CD4(+) T cells specific for defined antigens according to CD154 expression.

Nature Medicine **11**: 1118-1124. DOI: 10.1038/nm1292.

Fu, H., E. J. Ward and F. M. Marelli-Berg (2016):

Mechanisms of T cell organotropism.

Cell Mol Life Sci **73**: 3009-3033. DOI: 10.1007/s00018-016-2211-4.

Gafa, V., M. E. Remoli, E. Giacomini, M. C. Gagliardi, R. Lande, M. Severa, R. Grillot and E. M. Coccia (2007):

In vitro infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment.

Microbes Infect **9**: 971-980. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.03.015.

Galagan, J. E., S. E. Calvo, C. Cuomo, L. J. Ma, J. R. Wortman, S. Batzoglou, S. I. Lee, M. Basturkmen, C. C. Spevak, J. Clutterbuck, V. Kapitonov, J. Jurka, C. Scazzocchio, M. Farman, J. Butler, S. Purcell, S. Harris, G. H. Braus, O. Draht, S. Busch, C. D'Enfert, C. Bouchier, G. H. Goldman, D. Bell-Pedersen, S. Griffiths-Jones, J. H. Doonan, J. Yu, K. Vienken, A. Pain, M. Freitag, E. U. Selker, D. B. Archer, M. A. Penalva, B. R. Oakley, M. Momany, T. Tanaka, T. Kumagai, K. Asai, M. Machida, W. C. Nierman, D. W. Denning, M. Caddick, M. Hynes, M. Paoletti, R. Fischer, B. Miller, P. Dyer, M. S. Sachs, S. A. Osmani and B. W. Birren (2005):

Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*.

Nature **438**: 1105-1115. DOI: 10.1038/nature04341.

Garlanda, C., E. Hirsch, S. Bozza, A. Salustri, M. De Acetis, R. Nota, A. Maccagno, F. Riva, B. Bottazzi, G. Peri, A. Doni, L. Vago, M. Botto, R. De Santis, P. Carminati, G. Siracusa, F. Altruda, A. Vecchi, L. Romani and A. Mantovani (2002):

Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response.

Nature **420**: 182-186. DOI: DOI 10.1038/nature01195.

Gaundar, S. S., L. Clancy, E. Blyth, W. Meyer and D. J. Gottlieb (2012):

Robust polyfunctional T-helper 1 responses to multiple fungal antigens from a cell population generated using an environmental strain of *Aspergillus fumigatus*.

Cytotherapy **14**: 1119-1130. DOI: 10.3109/14653249.2012.704013.

Gavaldà, J., M. T. Martín, P. López, X. Gomis, J. L. Ramírez, D. Rodríguez, O. Len, Y. Puigfel, I. Ruiz and A. Pahissa (2005):

Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**: 3028-3030. DOI: 10.1128/Aac.49.7.3028-3030.2005.

Geiser, D. M., C. Gueidan, J. Miadlikowska, F. Lutzoni, F. Kauff, V. Hofstetter, E. Fraker, C. L. Schoch, L. Tibell, W. A. Untereiner and A. Aptroot (2006):

Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae.

Mycologia **98**: 1053-1064. DOI: 10.3852/mycologia.98.6.1053.

Gerner, W., S. C. Talker, H. C. Koinig, C. Sedlak, K. H. Mair and A. Saalmüller (2015):

Phenotypic and functional differentiation of porcine alpha beta T cells: Current knowledge and available tools.

Molecular Immunology **66**: 3-13. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.10.025.

Ghez, D., A. Calleja, C. Protin, M. Baron, M. P. Ledoux, G. Damaj, M. Dupont, B. Dreyfus, E. Ferrant, C. Herbaux, K. Laribi, R. Le Calloch, M. Malphettes, F. Paul, L. Souchet, M. Truchan-Graczyk, K. Delavigne, C. Dartigeas, L. Ysebaert and F. I. L. O. FIL (2018):

Early-onset invasive aspergillosis and other fungal infections in patients treated with ibrutinib.

Blood **131**: 1955-1959. DOI: 10.1182/blood-2017-11-818286.

Goriely, S., M. F. Neurath and M. Goldman (2008):

How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members.

Nature Reviews Immunology **8**: 81-86. DOI: 10.1038/nri2225.

Greene, R. E., H. T. Schlamm, J. W. Oestmann, P. Stark, C. Durand, O. Lortholary, J. R. Wingard, R. Herbrecht, P. Ribaud, T. F. Patterson, P. F. Troke, D. W. Denning, J. E. Bennett, B. E. de Pauw and R. H. Rubin (2007):

Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis: Clinical significance of the halo sign.

Clinical Infectious Diseases **44**: 373-379. DOI: Doi 10.1086/509917.

Guerra, E. S., C. K. Lee, C. A. Specht, B. Yadav, H. B. Huang, A. Akalin, J. R. Huh, C. Mueller and S. M. Levitz (2017):

Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma.

Plos Pathogens **13**. DOI: ARTN e1006175
10.1371/journal.ppat.1006175.

Guerre, P. (2016):

Worldwide Mycotoxins Exposure in Pig and Poultry Feed Formulations.

Toxins **8**. DOI: 10.3390/toxins8120350.

Guillot, J., C. Collobert, E. Gueho, M. Mialot and E. Lagarde (1997):
Emericella nidulans as an agent of guttural pouch mycosis in a horse.
Journal of Medical and Veterinary Mycology **35**: 433-435.

Hamilton, H. L., R. D. Whitley and S. A. McLaughlin (2000):
Exophthalmos secondary to aspergillosis in a cat.
Journal of the American Animal Hospital Association **36**: 343-347. DOI: Doi
10.5326/15473317-36-4-343.

Harada, K., M. Muramatsu, S. Suzuki, Y. Tamura, T. Sawada and T. Takahashi (2011):
Evaluation on the pathogenicity of *Erysipelothrix tonsillarum* for pigs by immunosuppression
with cyclophosphamide or dexamethasone.
Res Vet Sci 90: 20-22. DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.05.009.

Hasenberg, M., J. Behnsen, S. Krappmann, A. Brakhage and M. Gunzer (2011):
Phagocyte responses towards *Aspergillus fumigatus*.
International Journal of Medical Microbiology **301**: 436-444. DOI: 10.1016/j.ijmm.2011.04.012.

Hattel, A. L., T. R. Drake, B. J. Anderholm and E. S. Mcallister (1991):
Pulmonary Aspergillosis Associated with Acute Enteritis in a Horse.
Journal of the American Veterinary Medical Association **199**: 589-590.

Hebart, H., C. Bollinger, P. Fisch, J. Sarfati, C. Meisner, M. Baur, J. Loeffler, M. Monod, J. P.
Latge and H. Einsele (2002):
Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and
patients with hematologic malignancies.
Blood **100**: 4521-4528. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0265.

Hellmann, A. M., J. Lothar, S. Wurster, M. B. Lutz, A. L. Schmitt, C. O. Morton, M. Eylich, K.
Czakai, H. Einsele and J. Loeffler (2017):
Human and Murine Innate Immune Cell Populations Display Common and Distinct Response
Patterns During Their In Vitro Interaction with the Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus*.
Frontiers in Immunology **8**. DOI: ARTN 1716
10.3389/fimmu.2017.01716.

Henzler, C., T. Henzler, D. Buchheidt, J. W. Nance, C. A. Weis, R. Vogelmann, U. Benck, T.
Viergutz, T. Becher, T. Boch, S. A. Klein, D. Heidenreich, L. Pilz, M. Meyer, P. M. Deckert, W.
K. Hofmann, S. O. Schoenberg and M. Reinwald (2017):
Diagnostic Performance of Contrast Enhanced Pulmonary Computed Tomography
Angiography for the Detection of Angioinvasive Pulmonary Aspergillosis in
Immunocompromised Patients.
Scientific Reports **7**. DOI: ARTN 4483
10.1038/s41598-017-04470-6.

Herbrecht, R., P. Bories, J. C. Moulin, M. P. Ledoux and V. Letscher-Bru (2012):
Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients.
Advances against Aspergillosis I **1272**: 23-30. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06829.x.

Herbrecht, R., D. W. Denning, T. F. Patterson, J. E. Bennett, R. E. Greene, J. W. Oestmann, W. V. Kern, K. A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. H. Rubin, J. R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P. H. Chandrasekar, M. R. Hodges, H. T. Schlamm, P. F. Troke, B. de Pauw, R. Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for, C. Treatment of and G. the Global *Aspergillus* Study (2002):
Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis.
N Engl J Med **347**: 408-415. DOI: 10.1056/NEJMoa020191.

Hernandez-Santos, N. and S. L. Gaffen (2012):
Th17 cells in immunity to *Candida albicans*.
Cell Host Microbe **11**: 425-435. DOI: 10.1016/j.chom.2012.04.008.

Hill, J. A., D. Li, K. A. Hay, M. L. Green, S. Cherian, X. Y. Chen, S. R. Riddell, D. G. Maloney, M. Boeckh and C. J. Turtle (2018):
Infectious complications of CD19-targeted chimeric antigen receptor-modified T-cell immunotherapy.
Blood **131**: 121-130. DOI: 10.1182/blood-2017-07-793760.

Hoeflinger, J. L., D. A. Coleman, S. H. Oh, M. J. Miller and L. L. Hoyer (2014):
A piglet model for studying *Candida albicans* colonization of the human oro-gastrointestinal tract.
FEMS Microbiol Lett **357**: 10-15. DOI: 10.1111/1574-6968.12500.

Hoenigl, M., J. Prattes, B. Spiess, J. Wagner, F. Pruellner, R. B. Raggam, V. Posch, W. Duettmann, K. Hoenigl, A. Wolfner, C. Koidl, W. Buzina, M. Reinwald, C. R. Thornton, R. Krause and D. Buchheidt (2014):
Performance of Galactomannan, Beta-D-Glucan, *Aspergillus* Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis.
Journal of Clinical Microbiology **52**: 2039-2045. DOI: 10.1128/Jcm.00467-14.

Hoerr, F. J. (2010):
Clinical Aspects of Immunosuppression in Poultry.
Avian Diseases **54**: 2-15. DOI: DOI 10.1637/8909-043009-Review.1.

Hohl, T. M., A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack and E. G. Pamer (2009):
Inflammatory Monocytes Facilitate Adaptive CD4 T Cell Responses during Respiratory Fungal Infection.
Cell Host & Microbe **6**: 470-481. DOI: 10.1016/j.chom.2009.10.007.

Horter, D. C., K. J. Yoon and J. J. Zimmerman (2003):

A review of porcine tonsils in immunity and disease.

Anim Health Res Rev **4**: 143-155. DOI: 10.1079/ahr200358.

Huang, L. N., N. N. Zhang, X. Huang, S. Y. Xiong, Y. Y. Feng, Y. Zhang, M. Li and Q. Y. Zhan (2019):

Invasive pulmonary aspergillosis in patients with influenza infection: A retrospective study and review of the literature.

Clinical Respiratory Journal **13**: 202-211. DOI: 10.1111/crj.12995.

Ibricevic, A., A. Pekosz, M. J. Walter, C. Newby, J. T. Battaile, E. G. Brown, M. J. Holtzman and S. L. Brody (2006):

Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells.

J Virol **80**: 7469-7480. DOI: 10.1128/JVI.02677-05.

Imanishi, T., H. Hara, S. Suzuki, N. Suzuki, S. Akira and T. Saito (2007):

Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions.

Journal of Immunology **178**: 6715-6719. DOI: DOI 10.4049/jimmunol.178.11.6715.

Jahreis, S., S. Bottcher, S. Hartung, T. Rachow, S. Rummeler, A. M. Dietl, H. Haas, G. Walther, A. Hochhaus and M. von Lilienfeld-Toal (2018):

Human MAIT cells are rapidly activated by *Aspergillus* spp. in an APC-dependent manner.

Eur J Immunol **48**: 1698-1706. DOI: 10.1002/eji.201747312.

Jensen, H. E., D. Stynen, J. Sarfati and J. P. Latge (1993):

Detection of Galactomannan and the 18-Kda Antigen from *Aspergillus-Fumigatus* in Serum and Urine from Cattle with Systemic Aspergillosis.

Journal of Veterinary Medicine Series B-Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health **40**: 397-408. DOI: DOI 10.1111/j.1439-0450.1993.tb00156.x.

Jepsen, C. S., L. K. Dubey, K. B. Colmorton, J. B. Moeller, M. A. Hammond, O. Nielsen, A. Schlosser, S. P. Templeton, G. L. Sorensen and U. Holmskov (2018):

FIBCD1 Binds *Aspergillus fumigatus* and Regulates Lung Epithelial Response to Cell Wall Components.

Frontiers in Immunology **9**. DOI: ARTN 1967
10.3389/fimmu.2018.01967.

Jochum, C., M. Beste, D. Stone, S. S. Graves and R. Storb (2008):

Development and in vitro characterization of canine CD40-Ig.

Veterinary Immunology and Immunopathology **123**: 260-265. DOI:
10.1016/j.vetimm.2008.02.005.

Jochum, C., M. Beste, E. Zellmer, S. S. Graves and R. Storb (2007):

CD154 blockade and donor-specific transfusions in DLA-identical marrow transplantation in dogs conditioned with 1-Gy total body irradiation.

Biol Blood Marrow Transplant **13**: 164-171. DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.10.031.

Johnson, E. M., K. L. Oakley, S. A. Radford, C. B. Moore, P. Warn, D. W. Warnock and D. W. Denning (2000):

Lack of correlation of in vitro amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection.

J Antimicrob Chemother **45**: 85-93. DOI: 10.1093/jac/45.1.85.

Jolink, H., R. de Boer, P. Hombrink, R. E. Jonkers, J. T. van Dissel, J. H. F. Falkenburg and M. H. M. Heemskerk (2017):

Pulmonary immune responses against *Aspergillus fumigatus* are characterized by high frequencies of IL-17 producing T-cells.

Journal of Infection **74**: 81-88. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.10.010.

Jolink, H., R. S. Hagedoorn, E. L. Lagendijk, J. W. Drijfhout, J. T. van Dissel, J. H. F. Falkenburg and M. H. M. Heemskerk (2014):

Induction of *A. fumigatus*-specific CD4-positive T cells in patients recovering from invasive aspergillosis.

Haematologica **99**: 1255-1263. DOI: 10.3324/haematol.2013.098830.

Jolink, H., I. C. Meijssen, R. S. Hagedoorn, M. Arentshorst, J. W. Drijfhout, A. Mulder, F. H. J. Claas, J. T. van Dissel, J. H. F. Falkenburg and M. H. M. Heemskerk (2013):

Characterization of the T-Cell-Mediated Immune Response Against the *Aspergillus fumigatus* Proteins Crf1 and Catalase 1 in Healthy Individuals.

Journal of Infectious Diseases **208**: 847-856. DOI: 10.1093/infdis/jit237.

Judge, E. P., J. M. L. Hughes, J. J. Egan, M. Maguire, E. L. Molloy and S. O'Dea (2014):

Anatomy and Bronchoscopy of the Porcine Lung A Model for Translational Respiratory Medicine.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **51**: 334-343. DOI: 10.1165/rcmb.2013-0453TR.

Karthaus, M. and D. Buchheidt (2013):

Invasive Aspergillosis: New Insights into Disease, Diagnostic and Treatment.

Current Pharmaceutical Design **19**: 3569-3594. DOI: Doi 10.2174/13816128113199990330.

Kaser, T., W. Gerner, S. E. Hammer, M. Patzl and A. Saalmuller (2008a):

Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes.

Vet Immunol Immunopathol **125**: 92-101. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.05.007.

Kaser, T., W. Gerner, S. E. Hammer, M. Patzl and A. Saalmuller (2008b):

Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells.

Veterinary Immunology and Immunopathology **122**: 153-158. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.08.002.

Kerr, S. C., G. J. Fischer, M. Sinha, O. McCabe, J. M. Palmer, T. Choera, F. Y. Lim, M. Wimmerova, S. D. Carrington, S. P. Yuan, C. A. Lowell, S. Oscarson, N. P. Keller and J. V. Fahy (2016):

FleA Expression in *Aspergillus fumigatus* Is Recognized by Fucosylated Structures on Mucins and Macrophages to Prevent Lung Infection.

Plos Pathogens **12**. DOI: ARTN e1005555
10.1371/journal.ppat.1005555.

Khanna, N., C. Stuehler, B. Conrad, S. Lurati, S. Krappmann, H. Einsele, C. Berges and M. S. Topp (2011):

Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154.

Blood **118**: 1121-1131. DOI: 10.1182/blood-2010-12-322610.

Kirchhoff, D., M. Frentsch, P. Leclerk, D. Bumann, S. Rausch, S. Hartmann, A. Thiel and A. Scheffold (2007):

Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression.

European Journal of Immunology **37**: 2370-2377. DOI: 10.1002/eji.200737322.

Knudtson, W. U. and C. A. Kirkbride (1992):

Fungi Associated with Bovine Abortion in the Northern Plains States (USA).

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **4**: 181-185. DOI: Doi 10.1177/104063879200400211.

Koguchi, Y., T. J. Thauland, M. K. Slifka and D. C. Parker (2007):

Preformed CD40 ligand exists in secretory lysosomes in effector and memory CD4(+) T cells and is quickly expressed on the cell surface in an antigen-specific manner.

Blood **110**: 2520-2527. DOI: 10.1182/blood-2007-03-081299.

Koinig, H. C., S. C. Talker, M. Stadler, A. Ladinig, R. Graage, M. Ritzmann, I. Hennig-Pauka, W. Gerner and A. Saalmuller (2015):

PCV2 vaccination induces IFN-gamma/TNF-alpha co-producing T cells with a potential role in protection.

Vet Res **46**: 20. DOI: 10.1186/s13567-015-0157-4.

Kosmidis, C. and D. W. Denning (2015):

The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis.

Thorax **70**: 270-277. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206291.

Kristiansen, A., A. M. Saunders, A. A. Hansen, P. H. Nielsen and J. L. Nielsen (2012):
Community structure of bacteria and fungi in aerosols of a pig confinement building.
Fems Microbiology Ecology **80**: 390-401. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01305.x.

Ku, Y. H., K. S. Chan, C. C. Yang, C. K. Tan, Y. C. Chuang and W. L. Yu (2017):
Higher mortality of severe influenza patients with probable aspergillosis than those with and
without other coinfections.
Journal of the Formosan Medical Association **116**: 660-670. DOI: 10.1016/j.jfma.2017.06.002.

Kuhlman, J. E., E. K. Fishman and S. S. Siegelman (1985):
Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo
sign, and the role of CT in early diagnosis.
Radiology **157**: 611-614. DOI: 10.1148/radiology.157.3.3864189.

Kumaresan, P. R., T. A. da Silva and D. P. Kontoyiannis (2018):
Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8(+) T Cells.
Frontiers in Immunology **8**. DOI: ARTN 1939
10.3389/fimmu.2017.01939.

Kumaresan, P. R., P. R. Manuri, N. D. Albert, S. Maiti, H. Singh, T. J. Mi, J. Roszik, B.
Rabinovich, S. Olivares, J. Krishnamurthy, L. Zhang, A. M. Najjar, M. H. Huls, D. A. Lee, R. E.
Champlin, D. P. Kontoyiannis and L. J. N. Cooper (2014):
Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**: 10660-
10665. DOI: 10.1073/pnas.1312789111.

Kunda, N. K., D. N. Price and P. Muttill (2018):
Respiratory Tract Deposition and Distribution Pattern of Microparticles in Mice Using Different
Pulmonary Delivery Techniques.
Vaccines **6**. DOI: ARTN 41
10.3390/vaccines6030041.

Kurtz, M. B., E. M. Bernard, F. F. Edwards, J. A. Marrinan, J. Dropinski, C. M. Douglas and D.
Armstrong (1995):
Aerosol and Parenteral Pneumocandins Are Effective in a Rat Model of Pulmonary
Aspergillosis.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy **39**: 1784-1789. DOI: Doi 10.1128/Aac.39.8.1784.

Lamoth, F. and T. Calandra (2017):
Early diagnosis of invasive mould infections and disease.
Journal of Antimicrobial Chemotherapy **72**: 119-128. DOI: 10.1093/jac/dkx030.

Las Heras, A., L. Dominguez, I. Lopez, M. J. Paya, L. Pena, P. Mazzucchelli, L. A. Garcia and J. F. Fernandez-Garayzabal (2000):

Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy.

Veterinary Record **147**: 578-580. DOI: DOI 10.1136/vr.147.20.578.

Latge, J. P. (1999):

Aspergillus fumigatus and aspergillosis.

Clin Microbiol Rev **12**: 310-350.

Latge, J. P. and A. Beauvais (2014):

Functional duality of the cell wall.

Curr Opin Microbiol **20**: 111-117. DOI: 10.1016/j.mib.2014.05.009.

Latge, J. P. and G. Chamilos (2020):

Aspergillus fumigatus and Aspergillosis in 2019.

Clinical Microbiology Reviews **33**. DOI: ARTN e00140-18
10.1128/CMR.00140-18.

Lazarevic, V., L. H. Glimcher and G. M. Lord (2013):

T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity.

Nature Reviews Immunology **13**: 777-789. DOI: 10.1038/nri3536.

Lee, B. O., L. Haynes, S. M. Eaton, S. L. Swain and T. D. Randall (2002):

The biological outcome of CD40 signaling is dependent on the duration of CD40 ligand expression: Reciprocal regulation by interleukin (IL)-4 and IL-12.

Journal of Experimental Medicine **196**: 693-704. DOI: 10.1084/jem.20020845.

Lee, S. I. and K. S. Kang (2019):

Omega-3 fatty acids modulate cyclophosphamide induced markers of immunosuppression and oxidative stress in pigs.

Scientific Reports **9**. DOI: ARTN 2684
10.1038/s41598-019-39458-x.

Lepage, O. M., M. F. Perron and J. L. Cadore (2004):

The mystery of fungal infection in the guttural pouches.

Veterinary Journal **168**: 60-64. DOI: 10.1016/S1090-0233(03)00108-4.

Lewis, R. E. and N. P. Wiederhold (2005):

Murine model of invasive aspergillosis.

Methods Mol Med **118**: 129-142. DOI: 10.1385/1-59259-943-5:129.

Li, J., J. L. Casanova and A. Puel (2018):

Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation.
Mucosal Immunol **11**: 581-589. DOI: 10.1038/mi.2017.97.

Lilly, L. M., M. Scopel, M. P. Nelson, A. R. Burg, C. W. Dunaway and C. Steele (2014):

Eosinophil Deficiency Compromises Lung Defense against *Aspergillus fumigatus*.
Infection and Immunity **82**: 1315-1325. DOI: 10.1128/iai.01172-13.

Lin, J. S., C. W. Yang, D. W. Wang and B. A. Wu-Hsieh (2005):

Dendritic cells cross-present exogenous fungal antigens to stimulate a protective CD8 T cell response in infection by *Histoplasma capsulatum*.

Journal of Immunology **174**: 6282-6291. DOI: DOI 10.4049/jimmunol.174.10.6282.

Lionakis, M. S., K. Dunleavy, M. Roschewski, B. C. Widemann, J. A. Butman, R. Schmitz, Y. Yang, D. E. Cole, C. Melani, C. S. Higham, J. V. Desai, M. Ceribelli, L. Chen, C. J. Thomas, R. F. Little, J. Gea-Banacloche, S. Bhaumik, M. Stetler-Stevenson, S. Pittaluga, E. S. Jaffe, J. Heiss, N. Lucas, S. M. Steinberg, L. M. Staudt and W. H. Wilson (2017a):

Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS Lymphoma.

Cancer Cell **31**: 833+. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.04.012.

Lionakis, M. S., I. D. Iliev and T. M. Hohl (2017b):

Immunity against fungi.

Jci Insight **2**. DOI: ARTN e93156

10.1172/jci.insight.93156.

Lionakis, M. S. and S. M. Levitz (2018):

Host Control of Fungal Infections: Lessons from Basic Studies and Human Cohorts.

Annual Review of Immunology, Vol **36**: 157-191. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053318.

Liu, H., M. J. Lee, N. V. Solis, Q. T. Phan, M. Swidergall, B. Ralph, A. S. Ibrahim, D. C. Sheppard and S. G. Filler (2017):

Aspergillus fumigatus CaIA binds to integrin alpha(5)beta(1) and mediates host cell invasion.

Nature Microbiology **2**. DOI: ARTN 16211

10.1038/nmicrobiol.2016.211.

Loures, F. V., M. Rohm, C. K. Lee, E. Santos, J. P. Wang, C. A. Specht, V. L. G. Calich, C. F. Urban and S. M. Levitz (2015):

Recognition of *Aspergillus fumigatus* Hyphae by Human Plasmacytoid Dendritic Cells Is Mediated by Dectin-2 and Results in Formation of Extracellular Traps.

Plos Pathogens **11**. DOI: ARTN e1004643

10.1371/journal.ppat.1004643.

Lu, L., J. Barbi and F. Pan (2017):

The regulation of immune tolerance by FOXP3.

Nature Reviews Immunology **17**: 703-717. DOI: 10.1038/nri.2017.75.

Mackie, E. J. (1981):

Immunosuppressive Effects of Cyclophosphamide in Pigs.

American Journal of Veterinary Research **42**: 189-194.

Maertens, J. A., Raad, II, K. A. Marr, T. F. Patterson, D. P. Kontoyiannis, O. A. Cornely, E. J. Bow, G. Rahav, D. Neofytos, M. Aoun, J. W. Baddley, M. Giladi, W. J. Heinz, R. Herbrecht, W. Hope, M. Karthaus, D. G. Lee, O. Lortholary, V. A. Morrison, I. Oren, D. Selleslag, S. Shoham, G. R. Thompson, 3rd, M. Lee, R. M. Maher, A. H. Schmitt-Hoffmann, B. Zeiher and A. J. Ullmann (2016):

Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial.

Lancet **387**: 760-769. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01159-9.

Mahnke, Y. D., T. M. Brodie, F. Sallusto, M. Roederer and E. Lugli (2013):

The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets.

Eur J Immunol **43**: 2797-2809. DOI: 10.1002/eji.201343751.

Maina, J. N. (2006):

Development, structure, and function of a novel respiratory organ, the lung-air sac system of birds: to go where no other vertebrate has gone.

Biological Reviews **81**: 545-579. DOI: 10.1017/S1464793106007111.

Martin, M. P., K. P. Bouck, J. Helm, M. J. Dykstra, D. P. Wages and H. J. Barnes (2007):

Disseminated *Aspergillus flavus* infection in broiler breeder pullets.

Avian Diseases **51**: 626-631. DOI: Doi 10.1637/0005-2086(2007)51[626:Dafiiib]2.0.Co;2.

Mason, R. W. (1971):

Porcine Mycotic Abortion Caused by *Aspergillus fumigatus*.

Australian Veterinary Journal **47**: 18-&. DOI: DOI 10.1111/j.1751-0813.1971.tb09196.x.

McClenny, N. (2005):

Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach.

Med Mycol **43** Suppl 1: S125-128. DOI: 10.1080/13693780500052222.

McFarlin, D. E. and R. M. Binns (1973):

Lymph node function and lymphocyte circulation in the pig.

Adv Exp Med Biol **29**: 87-93. DOI: 10.1007/978-1-4615-9017-0_13.

Mengesha, B. G. and H. R. Conti (2017):

The Role of IL-17 in Protection against Mucosal *Candida* Infections.

Journal of Fungi **3**. DOI: ARTN 52
10.3390/jof3040052.

Mestas, J. and C. C. Hughes (2004):

Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.

J Immunol **172**: 2731-2738. DOI: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.

Meurens, F., A. Summerfield, H. Nauwynck, L. Saif and V. Gerdtts (2012):

The pig: a model for human infectious diseases.

Trends in Microbiology **20**: 50-57. DOI: 10.1016/j.tim.2011.11.002.

Moalli, F., A. Doni, L. Deban, T. Zelante, S. Zagarella, B. Bottazzi, L. Romani, A. Mantovani and C. Garlanda (2010):

Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*.

Blood **116**: 5170-5180. DOI: 10.1182/blood-2009-12-258376.

Montagna, M. T., G. Lovero, C. Coretti, D. Martinelli, M. Delia, O. De Giglio, M. Caira, F. Puntillo, D. D'Antonio, M. Venditti, V. Sambri, F. Di Bernardo, A. Barbui, G. Lo Cascio, E. Concia, M. Mikulska, C. Viscoli, N. Maximova, A. Candoni, S. Oliveri, G. Lombardi, L. Pitzurra, M. Sanguinetti, R. Masciari, T. Santantonio, S. Andreoni, F. Barchiesi, P. Pecile, C. Farina, P. Viale, G. Specchia, G. Caggiano and L. Pagano (2014):

SIMIFF study: Italian fungal registry of mold infections in hematological and non-hematological patients.

Infection **42**: 141-151. DOI: 10.1007/s15010-013-0539-3.

Moretti, S., G. Renga, V. Oikonomou, C. Galosi, M. Pariano, R. G. Iannitti, M. Borghi, M. Puccetti, M. De Zuani, C. E. Pucillo, G. Paolicelli, T. Zelante, J. C. Renauld, O. Bereshchenko, P. Sportoletti, V. Lucidi, M. C. Russo, C. Colombo, E. Fiscarelli, C. Lass-Flörl, F. Majo, G. Ricciotti, H. Ellemunter, L. Ratclif, V. N. Talesa, V. Napolioni and L. Romani (2017):

A mast cell-ILC2-Th9 pathway promotes lung inflammation in cystic fibrosis.

Nat Commun **8**: 14017. DOI: 10.1038/ncomms14017.

Mueller, S. N., T. Gebhardt, F. R. Carbone and W. R. Heath (2013):

Memory T Cell Subsets, Migration Patterns, and Tissue Residence.

Annual Review of Immunology, Vol **31**: 137-161. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095954.

Muirhead, M. R., T. J. L. Alexander and J. Carr (2013):

Managing Pig Health: A Reference for the Farm. 5m Publishing.

2., illustrierte, überarbeitete Auflage, United Kingdom: 5M Publishing

ISBN: 0955501156, 9780955501159

Murdock, B. J., N. R. Falkowski, A. B. Shreiner, A. A. S. Akha, R. A. McDonald, E. S. White, G. B. Toews and G. B. Huffnagle (2012):

Interleukin-17 Drives Pulmonary Eosinophilia following Repeated Exposure to *Aspergillus fumigatus* Conidia.

Infection and Immunity **80**: 1424-1436. DOI: 10.1128/iai.05529-11.

Nakakuki, S. (1994):

Bronchial Tree, Lobular Division and Blood-Vessels of the Pig Lung.

Journal of Veterinary Medical Science **56**: 685-689. DOI: DOI 10.1292/jvms.56.685.

Nanjappa, S. G., E. Heninger, M. Wuthrich, D. J. Gasper and B. S. Klein (2012a):

Tc17 cells mediate vaccine immunity against lethal fungal pneumonia in immune deficient hosts lacking CD4+ T cells.

PLoS Pathog **8**: e1002771. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002771.

Nanjappa, S. G., E. Heninger, M. Wuthrich, T. Sullivan and B. Klein (2012b):

Protective antifungal memory CD8(+) T cells are maintained in the absence of CD4(+) T cell help and cognate antigen in mice.

Journal of Clinical Investigation **122**: 987-999. DOI: 10.1172/Jci58762.

Neofytos, D., O. Chatzis, D. Nasioudis, E. Boely Janke, T. Doco Lecompte, C. Garzoni, C. Berger, A. Cussini, K. Boggian, N. Khanna, O. Manuel, N. J. Mueller, C. van Delden and S. Swiss Transplant Cohort (2018):

Epidemiology, risk factors and outcomes of invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients in the Swiss Transplant Cohort Study.

Transpl Infect Dis **20**: e12898. DOI: 10.1111/tid.12898.

Nesbit, J. W. (1986):

The Pathology of Pulmonary Aspergillosis in a Piglet.

Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging **57**: 125-127.

Neumann (2016):

Aspergillosis in Domesticated Birds.

Journal of Comparative Pathology **155**: 102-104. DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.07.003.

Newton, P. J., C. Harris, J. Morris and D. W. Denning (2016):

Impact of liposomal amphotericin B therapy on chronic pulmonary aspergillosis.

Journal of Infection **73**: 485-495. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.06.001.

Nucci, M., S. A. Nouer, M. Graziutti, N. S. Kumar, B. Barlogie and E. Anaissie (2010):

Probable Invasive Aspergillosis without Prespecified Radiologic Findings: Proposal for Inclusion of a New Category of Aspergillosis and Implications for Studying Novel Therapies.

Clinical Infectious Diseases **51**: 1273-1280. DOI: 10.1086/657065.

O'Dea, E. M., N. Amarsaikhan, H. T. Li, J. Downey, E. Steele, S. J. Van Dyken, R. M. Locksley and S. P. Templeton (2014):

Eosinophils Are Recruited in Response to Chitin Exposure and Enhance Th2-Mediated Immune Pathology in *Aspergillus fumigatus* Infection.

Infection and Immunity **82**: 3199-3205. DOI: 10.1128/iai.01990-14.

O'Gorman, C. M., H. T. Fuller and P. S. Dyer (2009):

Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*.

Nature **457**: 471-U475. DOI: 10.1038/nature07528.

Oestreich, K. J. and A. S. Weinmann (2012):

T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription.

Trends in Immunology **33**: 78-83. DOI: 10.1016/j.it.2011.10.005.

Oppliger, A. and P. Duquenne (2016):

Highly Contaminated Workplaces.

Environmental Mycology in Public Health: 79-105.

Osharov, N. (2012):

Interaction of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* with lung epithelial cells.

Frontiers in Microbiology **3**. DOI: ARTN 346

10.3389/fmicb.2012.00346.

Pampusch, M. S., A. M. Bennaars, S. Harsch and M. P. Murtaugh (1998):

Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells.

Veterinary Immunology and Immunopathology **61**: 279-289. DOI: Doi 10.1016/S0165-2427(97)00139-6.

Paoletti, M., C. Rydholm, E. U. Schwier, M. J. Anderson, G. Szakacs, F. Lutzoni, J. P. Debeaupuis, J. P. Latge, D. W. Denning and P. S. Dyer (2005):

Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*.

Current Biology **15**: 1242-1248. DOI: 10.1016/j.cub.2005.05.045.

Papadopoulou, A., M. Alvanou, K. Koukoulis, E. Athanasiou, A. Lazaridou, N. Savvopoulos, P. Kaloyannidis, A. M. Markantonatou, T. A. Vyzantiadis, M. Yiangou, A. Anagnostopoulos and E. Yannaki (2019):

Clinical-scale production of *Aspergillus*-specific T cells for the treatment of invasive aspergillosis in the immunocompromised host.

Bone Marrow Transplant **54**(12):1963-1972. DOI: 10.1038/s41409-019-0501-9.

Papadopoulou, A., P. Kaloyannidis, E. Yannaki and C. R. Cruz (2016):

Adoptive transfer of *Aspergillus*-specific T cells as a novel anti-fungal therapy for hematopoietic stem cell transplant recipients: Progress and challenges.

Critical Reviews in Oncology Hematology **98**: 62-72. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.10.005.

Pappas, P. G., B. D. Alexander, D. R. Andes, S. Hadley, C. A. Kauffman, A. Freifeld, E. J. Anaissie, L. M. Brumble, L. Herwaldt, J. Ito, D. P. Kontoyiannis, G. M. Lyon, K. A. Marr, V. A. Morrison, B. J. Park, T. F. Patterson, T. M. Perl, R. A. Oster, M. G. Schuster, R. Walker, T. J. Walsh, K. A. Wannemuehler and T. M. Chiller (2010):

Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET).

Clinical Infectious Diseases **50**: 1101-1111. DOI: 10.1086/651262.

Park, J. H., F. A. Romero, Y. Taur, M. Sadelain, R. J. Brentjens, T. M. Hohl and S. K. Seo (2018):

Cytokine Release Syndrome Grade as a Predictive Marker for Infections in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Chimeric Antigen Receptor T Cells.

Clinical Infectious Diseases **67**: 533-540. DOI: 10.1093/cid/ciy152.

Park, S. J. and B. Mehrad (2009):

Innate immunity to *Aspergillus* species.

Clin Microbiol Rev **22**: 535-551. DOI: 10.1128/CMR.00014-09.

Parulekar, A. D., Z. Diamant and N. A. Hanania (2015):

Antifungals in severe asthma.

Current Opinion in Pulmonary Medicine **21**: 48-54. DOI: 10.1097/Mcp.0000000000000117.

Patterson, T. F. and J. P. Donnelly (2019):

New Concepts in Diagnostics for Invasive Mycoses: Non-Culture-Based Methodologies.

Journal of Fungi **5**. DOI: UNSP 9
10.3390/jof5010009.

Patterson, T. F., G. R. Thompson, 3rd, D. W. Denning, J. A. Fishman, S. Hadley, R. Herbrecht, D. P. Kontoyiannis, K. A. Marr, V. A. Morrison, M. H. Nguyen, B. H. Segal, W. J. Steinbach, D. A. Stevens, T. J. Walsh, J. R. Wingard, J. A. Young and J. E. Bennett (2016):

Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America.

Clin Infect Dis **63**: e1-e60. DOI: 10.1093/cid/ciw326.

Peeters, D., I. R. Peters, C. Clercx and M. J. Day (2006):

Quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in nasal biopsies from dogs with sino-nasal aspergillosis.

Veterinary Microbiology **114**: 318-326. DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.11.065.

Peeters, D., I. R. Peters, C. R. Helps, A. Gabriel, M. J. Day and C. Clercx (2007):

Distinct tissue cytokine and chemokine mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis.

Veterinary Immunology and Immunopathology **117**: 95-105. DOI:
10.1016/j.vetimm.2007.01.018.

Perruccio, K., F. Topini, A. Tosti, M. V. Gazzola, C. Messina, M. F. Martelli, M. Caniglia, A. Velardi and S. Cesaro (2015):

Differences in *Aspergillus*-specific immune recovery between T-cell-replete and T-cell-depleted hematopoietic transplants.

European Journal of Haematology **95**: 551-557. DOI: 10.1111/ejh.12531.

Perruccio, K., A. Tosti, E. Burchielli, F. Topini, L. Ruggeri, A. Carotti, M. Capanni, E. Urbani, A. Mancusi, F. Aversa, M. F. Martelli, L. Romani and A. Velardi (2005):

Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation.

Blood **106**: 4397-4406. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1775.

Phalen, R. F., M. J. Oldham and R. K. Wolff (2008):

The relevance of animal models for aerosol studies.

Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery **21**: 113-124. DOI: 10.1089/jamp.2007.0673.

Pierron, A., I. Alassane-Kpembi and I. P. Oswald (2016):

Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health.

Animal Nutrition **2**: 63-68. DOI: 10.1016/j.aninu.2016.03.001.

Pini, G., E. Faggi, R. Donato, C. Sacco and R. Fanci (2008):

Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients and the influence of hospital renovation.

Mycoses **51**: 117-122. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2007.01453.x.

Platzbecker, U., J. Stoeilmacher, C. Pabst, E. Goekkurt, U. Oelschlaegel, H. Schirutschke, K. Holig, C. Theuser, U. Mogck, G. Ehninger and M. Bornhauser (2008):

Induction of Toll-like receptor 2 and 4 expression on CD4(+) and CD8(+) T cells in G-CSF-mobilized unrelated peripheral blood stem cell grafts during leukapheresis: impact on patient outcome.

Leukemia **22**: 1438-1440. DOI: 10.1038/sj.leu.2405075.

Polley, R., S. Zubairi and P. M. Kaye (2005):

The fate of heterologous CD4+ T cells during *Leishmania donovani* infection.

European Journal of Immunology **35**: 498-504. DOI: 10.1002/eji.200425436.

Pomorska-Mol, M. and I. Markowska-Daniel (2011):

Age-Dependent Changes in Relative and Absolute Size of Lymphocyte Subsets in the Blood of Pigs from Birth to Slaughter.

Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy **55**: 305-310.

Potenza, L., P. Barozzi, D. Vallerini, R. Bosco, C. Quadrelli, L. Mediani, M. Morselli, F. Forghieri, F. Volzone, M. Codeluppi, G. Rossi, G. Tazzioli, C. Venturelli, G. Torelli and M. Luppi (2007):

Diagnosis of invasive aspergillosis by tracking *Aspergillus*-specific T cells in hematologic patients with pulmonary infiltrates.

Leukemia **21**: 578-581. DOI: 10.1038/sj.leu.2404504.

Potenza, L., D. Vallerini, P. Barozzi, G. Riva, F. Forghieri, A. Beauvais, R. Beau, A. Candoni, J. Maertens, G. Rossi, M. Morselli, E. Zanetti, C. Quadrelli, M. Codeluppi, G. Guaraldi, L. Pagano, M. Caira, C. Del Giovane, M. Maccaferri, A. Stefani, U. Morandi, G. Tazzioli, M. Girardis, M. Delia, G. Specchia, G. Longo, R. Marasca, F. Narni, F. Merli, A. Imovilli, G. Apolone, A. Carvalho, P. Comoli, L. Romani, J. P. Latge and M. Luppi (2013):

Characterization of Specific Immune Responses to Different *Aspergillus* Antigens during the Course of Invasive Aspergillosis in Hematologic Patients.

Plos One **8**. DOI: ARTN e74326
10.1371/journal.pone.0074326.

Powers-Fletcher, M. V. and K. E. Hanson (2016):

Molecular Diagnostic Testing for *Aspergillus*.

Journal of Clinical Microbiology **54**: 2655-2660. DOI: 10.1128/Jcm.00818-16.

Price, T. H., M. Boeckh, R. W. Harrison, J. McCullough, P. M. Ness, R. G. Strauss, W. G. Nichols, T. H. Hamza, M. M. Cushing, K. E. King, J. A. H. Young, E. Williams, J. McFarland, J. H. Chakrabarty, S. R. Sloan, D. Friedman, S. Parekh, B. S. Sachais, J. E. Kiss and S. F. Assmann (2015):

Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone-treated donors in neutropenic patients with infection.

Blood **126**: 2153-2161. DOI: 10.1182/blood-2015-05-645986.

Puntenney, S., Y. Wang and N. Forsberg (2003):

Mycotic infections in livestock: Recent insights and studies on etiology, diagnostics and prevention of Hemorrhagic Bowel Syndrome.

Southwest Nutrition & Management Conference 2003 Phoenix, Tuscon University of Arizona, Department of Animal Science.

Rajao, D. S. and A. L. Vincent (2015):

Swine as a Model for *Influenza A Virus* Infection and Immunity.

Illar Journal **56**: 44-52. DOI: 10.1093/ilar/ilv002.

Ramadan, G., S. Konings, V. P. Kurup and C. A. Keever-Taylor (2004):

Generation of *Aspergillus*- and CMV-specific T-cell responses using autologous fast DC.

Cytotherapy **6**: 223-234. DOI: 10.1080/14653240410006040.

Ramirez-Ortiz, Z. G., C. K. Lee, J. P. Wang, L. Boon, C. A. Specht and S. M. Levitz (2011):
A Nonredundant Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Host Defense against the Human
Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*.

Cell Host & Microbe **9**: 415-424. DOI: 10.1016/j.chom.2011.04.007.

Raphael, I., S. Nalawade, T. N. Eagar and T. G. Forsthuber (2015):

T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases.

Cytokine **74**: 5-17. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.09.011.

Reischies, F. and M. Hoenigl (2014):

The role of surgical debridement in different clinical manifestations of invasive aspergillosis.

Mycoses **57**: 1-14. DOI: 10.1111/myc.12224.

Relle, M., T. Thomaidis, P. R. Galle and A. Schwarting (2011):

Comparative aspects of murine proteinase 3.

Rheumatology International **31**: 1105-1111. DOI: 10.1007/s00296-010-1672-2.

Reutner, K., J. Leitner, A. Müllebner, A. Ladinig, S. E. Essler, J. C. Duvigneau, M. Ritzmann,
P. Steinberger, A. Saalmuller and W. Gerner (2013):

CD27 expression discriminates porcine T helper cells with functionally distinct properties.

Vet Res **44**: 18. DOI: 10.1186/1297-9716-44-18.

Reynolds, G. and M. Haniffa (2015):

Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species?

Front Immunol **6**: 330. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00330.

Rivera, A., T. M. Hohl, N. Collins, I. Leiner, A. Gallegos, S. Saijo, J. W. Coward, Y. Iwakura
and E. G. Pamer (2011):

Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type
1 CD4 T cell differentiation.

J Exp Med **208**: 369-381. DOI: 10.1084/jem.20100906.

Rivera, A., G. Ro, H. L. Van Epps, T. Simpson, I. Leiner, D. B. Sant'Angelo and E. G. Pamer
(2006):

Innate immune activation and CD4(+) T cell priming during respiratory fungal infection.

Immunity **25**: 665-675. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.016.

Robin, C., C. Cordonnier, K. Sitbon, N. Raus, O. Lortholary, S. Maury, R. P. de la Tour, S. Bretagne, S. Bastuji-Garin, D. Ajzenberg, M. T. Baixench, M. Bernard, A. L. Bienvenu, K. Bilger, M. E. Bougnoux, J. H. Bourhis, P. Ceballos, J. Chandener, P. Chevallier, E. Dannaoui, E. Daguindau, G. Damaj, M. Fines, J. P. Gangneux, M. Gari-Toussaint, G. Guillerme, F. G. Andrieu, N. Ifrah, C. Kauffman, C. Lacroix, B. Lebeau, V. Letscher, M. Machouart, N. Maillard, M. Michallet, L. Million, N. Milpied, F. de Monbrison, B. Perard, J. L. Poirot, D. Quinio, S. Ranque, P. S. Rohrlich, M. T. Rubio, Y. Sterkers, G. Socie, F. Suarez, A. Thiebault-Bertrand, P. Turlure, S. S. A. In and S.-T. S. F. G. M (2019):

Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Societe Francophone de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire.

Biology of Blood and Marrow Transplantation **25**: 354-361. DOI: 10.1016/j.bbmt.2018.09.028.

Rodriguez-Gomez, I. M., S. C. Talker, T. Kaser, M. Stadler, S. E. Hammer, A. Saalmuller and W. Gerner (2016):

Expression of T-bet, Eomesodermin and GATA-3 in porcine alphabeta T cells.

Dev Comp Immunol **60**: 115-126. DOI: 10.1016/j.dci.2016.02.022.

Rohm, M., M. J. Grimm, A. C. D'Auria, N. G. Almyroudis, B. H. Segal and C. F. Urban (2014):

NADPH Oxidase Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pulmonary Aspergillosis.

Infection and Immunity **82**: 1766-1777. DOI: 10.1128/iai.00096-14.

Rolle, A. M., M. Hasenberg, C. R. Thornton, D. Solouk-Saran, L. Mann, J. Weski, A. Maurer, E. Fischer, P. R. Spycher, R. Schibli, F. Boschetti, S. Stegemann-Koniszewski, D. Bruder, G. W. Severin, S. E. Autenrieth, S. Krappmann, G. Davies, B. J. Pichler, M. Gunzer and S. Wiehr (2016):

ImmunoPET/MR imaging allows specific detection of *Aspergillus fumigatus* lung infection in vivo.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **113**: E1026-E1033. DOI: 10.1073/pnas.1518836113.

Romani, L. (2011):

Immunity to fungal infections.

Nature Reviews Immunology **11**: 275-288. DOI: 10.1038/nri2939.

Rosen, K., F. Ebner, S. Schmidt, S. Hartmann, R. Merle, A. Friese and U. Rösler (2020):

Influence of immune status on the airborne colonization of piglets with methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) clonal complex (CC) 398.

European Journal of Microbiology and Immunology **10**: 1-10. DOI: 10.1556/1886.2019.00024.

Rosen, K., U. Roesler, R. Merle and A. Friese (2018):

Persistent and Transient Airborne MRSA Colonization of Piglets in a Newly Established Animal Model.

Front Microbiol **9**: 1542. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01542.

Rothkotter, H. J. (2009):

Anatomical particularities of the porcine immune system--a physician's view.

Dev Comp Immunol **33**: 267-272. DOI: 10.1016/j.dci.2008.06.016.

Rozkova, D., R. Horvath, J. Bartunkova and R. Spisek (2006):

Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors.

Clin Immunol **120**: 260-271. DOI: 10.1016/j.clim.2006.04.567.

Ruhnke, M., G. Behre, D. Buchheidt, M. Christopeit, A. Hamprecht, W. Heinz, C. P. Heussel, M. Horger, O. Kurzai, M. Karthaus, J. Loffler, G. Maschmeyer, O. Penack, C. Rieger, V. Rickerts, J. Ritter, M. Schmidt-Hieber, N. Schuelper, S. Schwartz, A. Ullmann, J. J. Vehreschild, M. von Lilienfeld-Toal, T. Weber and H. H. Wolf (2018):

Diagnosis of invasive fungal diseases in haematology and oncology: 2018 update of the recommendations of the infectious diseases working party of the German society for hematology and medical oncology (AGIHO).

Mycoses **61**: 796-813. DOI: 10.1111/myc.12838.

Saalmüller, A. and W. Gerner (2016):

The Immune System of Swine.

Encyclopedia of Immunobiology: 538-548.

1. Auflage, Oxford: Elsevier

ISBN: 9780123742797

Sabino, R., V. M. Faisca, E. Carolino, C. Verissimo and C. Viegas (2012):

Occupational exposure to *Aspergillus* by swine and poultry farm workers in Portugal.

J Toxicol Environ Health A **75**: 1381-1391. DOI: 10.1080/15287394.2012.721170.

Sackstein, R., T. Schatton and S. R. Barthel (2017):

T-lymphocyte homing: an underappreciated yet critical hurdle for successful cancer immunotherapy.

Laboratory Investigation **97**: 669-697. DOI: 10.1038/labinvest.2017.25.

Sang, Y., P. Ruchala, R. I. Lehrer, C. R. Ross, R. R. Rowland and F. Blecha (2009):

Antimicrobial host defense peptides in an arteriviral infection: differential peptide expression and virus inactivation.

Viral Immunol **22**: 235-242. DOI: 10.1089/vim.2009.0005.

Santiago, V., K. Rezvani, T. Sekine, J. Stebbing, P. Kelleher and D. Armstrong-James (2018):
Human NK Cells Develop an Exhaustion Phenotype During Polar Degranulation at the *Aspergillus fumigatus* Hyphal Synapse.

Frontiers in Immunology **9**. DOI: ARTN 2344
10.3389/fimmu.2018.02344.

Santosuosso, M., M. Divangahi, A. Zganiacz and Z. Xing (2002):

Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage-colony-stimulating factor gene transfer.

Blood **99**: 1246-1252. DOI: DOI 10.1182/blood.V99.4.1246.

Sarfati, J., H. E. Jensen and J. P. Latge (1996):

Route of infections in bovine aspergillosis.

J Med Vet Mycol **34**: 379-383. DOI: 10.1080/02681219680000681.

Sasaki, K., R. Pabst and H. J. Rothkotter (1994):

The unique ultrastructure of high-endothelial venules in inguinal lymph nodes of the pig.

Cell Tissue Res **276**: 85-90. DOI: 10.1007/BF00354787.

Schauwvlieghe, A. F. A. D., B. J. A. Rijnders, N. Philips, R. Verwijs, L. Vanderbeke, C. Van Tienen, K. Lagrou, P. E. Verweij, F. L. Van de Veerdonk, D. Gommers, P. Spronk, D. C. J. J. Bergmans, A. Hoedemaekers, E. R. Andrinopoulou, C. H. S. B. van den Berg, N. P. Juffermans, C. J. Hodiamont, A. G. Vonk, P. Depuydt, J. Boelens, J. wauters and D. B. M. S. Grp (2018):

Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study.

Lancet Respiratory Medicine **6**: 782-792. DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30274-1.

Scheffold, A., C. Schwarz and P. Bacher (2018):

Fungus-Specific CD4 T Cells as Specific Sensors for Identification of Pulmonary Fungal Infections.

Mycopathologia **183**: 213-226. DOI: 10.1007/s11046-017-0229-2.

Schmidt, A. (2002):

Animal models of aspergillosis - also useful for vaccination strategies?

Mycoses **45**: 38-40. DOI: DOI 10.1046/j.1439-0507.2002.d01-111.x.

Schmidt, A. and D. I. Schmidt (1999):

J.B. Georg W. Fresenius and the description of the species *Aspergillus fumigatus* in 1863.

Contrib Microbiol **2**: 1-4. DOI: 10.1159/000060300.

Schoenbrunn, A., M. Frentsch, S. Kohler, J. Keye, H. Dooms, B. Moewes, J. Dong, C. Loddenkemper, J. Sieper, P. Wu, C. Romagnani, N. Matzmohr and A. Thiel (2012):

A converse 4-1BB and CD40 ligand expression pattern delineates activated regulatory T cells (Treg) and conventional T cells enabling direct isolation of alloantigen-reactive natural Foxp3+ Treg.

J Immunol **189**: 5985-5994. DOI: 10.4049/jimmunol.1201090.

Schwienbacher, M. A. (2005):

Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen des humanpathogenen Schimmelpilzes *Aspergillus fumigatus*, die während der Auskeimung differentiell exprimiert werden.

Technische Universität München.

Seif, M., H. Einsele and J. Löffler (2019):

CAR T Cells Beyond Cancer: Hope for Immunomodulatory Therapy of Infectious Diseases.

Frontiers in Immunology **10**. DOI: ARTN 2711
10.3389/fimmu.2019.02711.

Semaniakou, A., R. P. Croll and V. Chappe (2019):

Animal Models in the Pathophysiology of Cystic Fibrosis.

Frontiers in Pharmacology **9**. DOI: ARTN 1475
10.3389/fphar.2018.01475.

Seyedmousavi, S., M. J. Davis, J. A. Sugui, T. Pinkhasov, S. Moyer, A. M. Salazar, Y. C. Chang and K. J. Kwon-Chung (2018):

Exogenous Stimulation of Type I Interferon Protects Mice with Chronic Granulomatous Disease from Aspergillosis through Early Recruitment of Host-Protective Neutrophils into the Lung.

Mbio **9**. DOI: ARTN e00422-18
10.1128/mBio.00422-18.

Seyedmousavi, S., J. Guillot, P. Arne, G. S. de Hoog, J. W. Mouton, W. J. G. Melchers and P. E. Verweij (2015):

Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease.

Medical Mycology **53**: 765-797. DOI: 10.1093/mmy/myv067.

Sharman, M. J. and C. S. Mansfield (2012):

Sinonasal aspergillosis in dogs: a review.

Journal of Small Animal Practice **53**: 434-444. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2012.01245.x.

Sharp, N. J. H., C. E. Harvey and M. Sullivan (1991):

Canine Nasal Aspergillosis and Penicilliosis.

Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian **13**: 41-&.

Sheppard, D. C., G. Rieg, L. Y. Chiang, S. G. Filler, J. E. Edwards, Jr. and A. S. Ibrahim (2004):
Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis.

Antimicrob Agents Chemother **48**: 1908-1911. DOI: 10.1128/aac.48.5.1908-1911.2004.

Sherman, A. B., A. B. Clode and B. C. Gilger (2017):

Impact of fungal species cultured on outcome in horses with fungal keratitis.

Veterinary Ophthalmology **20**: 140-146. DOI: 10.1111/vop.12381.

Shortman, K. and Y. J. Liu (2002):

Mouse and human dendritic cell subtypes.

Nature Reviews Immunology **2**: 151-161. DOI: DOI 10.1038/nri746.

Sinkora, M., J. E. Butler, K. M. Lager, H. Potockova and J. Sinkorova (2014):

The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2.

Vet Res **45**: 91. DOI: 10.1186/s13567-014-0091-x.

Sobek, V., N. Birkner, I. Falk, A. Wurch, C. J. Kirschning, H. Wagner, R. Wallich, M. C. Lamers and M. M. Simon (2004):

Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease.

Arthritis Research & Therapy **6**: R433-R446. DOI: 10.1186/ar1212.

Springer, J., M. Lackner, D. Nachbaur, M. Girschikofsky, B. Risslegger, W. Mutschlechner, J. Fritz, W. J. Heinz, H. Einsele, A. J. Ullmann, J. Löffler and C. Lass-Flörl (2016):

Prospective multicentre PCR-based *Aspergillus* DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis.

Clinical Microbiology and Infection **22**: 80-86. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.09.009.

Springer, J., J. Loeffler, W. Heinz, H. Schlossnagel, M. Lehmann, O. Morton, T. R. Rogers, C. Schmitt, M. Frosch, H. Einsele and O. Kurzai (2011):

Pathogen-Specific DNA Enrichment Does Not Increase Sensitivity of PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Neutropenic Patients.

Journal of Clinical Microbiology **49**: 1267-1273. DOI: 10.1128/Jcm.01679-10.

Springer, J., H. Schlossnagel, W. Heinz, T. Doedt, R. Soeller, H. Einsele and J. Loeffler (2012):
A Novel Extraction Method Combining Plasma with a Whole-Blood Fraction Shows Excellent Sensitivity and Reproducibility for Patients at High Risk for Invasive Aspergillosis.

Journal of Clinical Microbiology **50**: 2585-2591. DOI: 10.1128/Jcm.00523-12.

Springer, J., P. L. White, J. Kessel, I. Wieters, D. Teschner, D. Korczynski, T. Liebrechts, O. A. Cornely, S. Schwartz, T. Elgeti, L. Meintker, S. W. Krause, R. B. Posso, W. J. Heinz, S. Fuhrmann, J. J. Vehreschild, H. Einsele, V. Rickerts and J. Loeffler (2018):

A Comparison of *Aspergillus* and Mucorales PCR Testing of Different Bronchoalveolar Lavage Fluid Fractions from Patients with Suspected Invasive Pulmonary Fungal Disease.

J Clin Microbiol **56**. DOI: 10.1128/JCM.01655-17.

Starbaek, S. M. R., L. Brogaard, H. D. Dawson, A. D. Smith, P. M. H. Heegaard, L. E. Larsen, G. Jungersen and K. Skovgaard (2018):

Animal Models for *Influenza A Virus* Infection Incorporating the Involvement of Innate Host Defenses: Enhanced Translational Value of the Porcine Model.

Illar Journal **59**: 323-337. DOI: 10.1093/ilar/ily009.

Steinbach, A., O. A. Cornely, H. Wisplinghoff, A. C. Schauss, J. J. Vehreschild, J. Rybniker, A. Hamprecht, A. Richter, P. Bacher, A. Scheffold and P. Koehler (2019):

Mould-reactive T cells for the diagnosis of invasive mould infection-A prospective study.

Mycoses **62**: 562-569. DOI: 10.1111/myc.12919.

Steinbach, W. J., D. K. Benjamin, Jr., S. A. Trasi, J. L. Miller, W. A. Schell, A. K. Zaas, W. M. Foster and J. R. Perfect (2004):

Value of an inhalational model of invasive aspergillosis.

Med Mycol **42**: 417-425. DOI: 10.1080/13693780410001712034.

Steinlage, S. J. T., J. E. Sander, T. P. Brown, C. M. Lobsinger, S. G. Thayer and A. Martinez (2003):

Disseminated mycosis in layer cockerels and pullets.

Avian Diseases **47**: 229-233. DOI: Doi 10.1637/0005-2086(2003)047[0229:Dmilca]2.0.Co;2.

Stuehler, C., J. Nowakowska, C. Bernardini, M. S. Topp, M. Battegay, J. Passweg and N. Khanna (2015):

Multispecific *Aspergillus* T cells selected by CD137 or CD154 induce protective immune responses against the most relevant mold infections.

J Infect Dis **211**: 1251-1261. DOI: 10.1093/infdis/jiu607.

Subramaniam, S., C. Overend, D. M. Yugo, C. L. Heffron, S. R. Matzinger, A. J. Rogers, D. B. Tian, Q. M. Cao, S. P. Kenney and X. J. Meng (2018):

Isolation of Peripheral Blood CD8 T Cells Specific to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Utilizing Porcine CD137 Activation Marker.

Viral Immunology **31**: 333-337. DOI: 10.1089/vim.2017.0189.

Such, K. A., V. Petraitis, R. Petraitiene, G. E. Strauss, P. W. Moradi and T. J. Walsh (2013):

Environmental Monitoring for *Aspergillus fumigatus* in Association with an Immunosuppressed Rabbit Model of Pulmonary Aspergillosis.

Journal of the American Association for Laboratory Animal Science **52**: 541-544.

Summerfield, A. and K. C. McCullough (2009):

The porcine dendritic cell family.

Developmental and Comparative Immunology **33**: 299-309. DOI: 10.1016/j.dci.2008.05.005.

Taccone, F. S., A. M. Van den Abeele, P. Bulpa, B. Misset, W. Meersseman, T. Cardoso, J. A. Paiva, M. Blasco-Navalpotro, E. De Laere, G. Dimopoulos, J. Rello, D. Vogelaers, S. I. Blot and I. C. U. S. I. Asp (2015):

Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes.

Crit Care **19**: 7. DOI: 10.1186/s13054-014-0722-7.

Takazono, T. and K. Izumikawa (2018):

Recent Advances in Diagnosing Chronic Pulmonary Aspergillosis.

Front Microbiol **9**: 1810. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01810.

Talker, S. C., H. C. Koinig, M. Stadler, R. Graage, E. Klingler, A. Ladinig, K. H. Mair, S. E. Hammer, H. Weissenbock, R. Durrwald, M. Ritzmann, A. Saalmuller and W. Gerner (2015):

Magnitude and kinetics of multifunctional CD4(+) and CD8 beta(+) T cells in pigs infected with swine *influenza A virus*.

Veterinary Research **46**. DOI: ARTN 52

10.1186/s13567-015-0182-3.

Talker, S. C., M. Stadler, H. C. Koinig, K. H. Mair, I. M. Rodriguez-Gomez, R. Graage, R. Zell, R. Durrwald, E. Starick, T. Harder, H. Weissenbock, B. Lamp, S. E. Hammer, A. Ladinig, A. Saalmuller and W. Gerner (2016):

Influenza A Virus Infection in Pigs Attracts Multifunctional and Cross-Reactive T Cells to the Lung.

J Virol **90**: 9364-9382. DOI: 10.1128/JVI.01211-16.

Taylor, P. R., S. Roy, S. M. Leal, Y. Sun, S. J. Howell, B. A. Cobb, X. X. Li and E. Pearlman (2014):

Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR gamma t and dectin-2.

Nature Immunology **15**: 143-151. DOI: 10.1038/ni.2797.

Tell, L. A. (2005):

Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine.

Med Mycol **43** Suppl 1: S71-73. DOI: 10.1080/13693780400020089.

Thangavel, R. R. and N. M. Bouvier (2014):

Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology.

Journal of Immunological Methods **410**: 60-79. DOI: 10.1016/j.jim.2014.03.023.

Todea, D. A., P. Postolache, L. E. Rosca and A. C. Coman (2014):

Pulmonary Aspergilloma and Pulmonary Tuberculosis: Is There a Strong Association?

Chest **145**. DOI: 10.1378/chest.1799127.

Tohno, M., T. Shimosato, M. Moue, H. Aso, K. Watanabe, Y. Kawai, T. Yamaguchi, T. Saito and H. Kitazawa (2006):

Toll-like receptor 2 and 9 are expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presuckling newborn swine.

Veterinary Research **37**: 791-812. DOI: 10.1051/vetres:2006036.

Tough, D. F., P. Borrow and J. Sprent (1996):

Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo.

Science **272**: 1947-1950. DOI: DOI 10.1126/science.272.5270.1947.

Tough, D. F., S. Sun and J. Sprent (1997):

T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS).

J Exp Med **185**: 2089-2094. DOI: 10.1084/jem.185.12.2089.

Tramsen, L., U. Koehl, T. Tonn, J. P. Latge, F. R. Schuster, A. Borkhardt, L. Uharek, R. Quaritsch, O. Beck, E. Seifried, T. Klingebiel and T. Lehrnbecher (2009):

Clinical-scale generation of human anti-*Aspergillus* T cells for adoptive immunotherapy.

Bone Marrow Transplantation **43**: 13-19. DOI: 10.1038/bmt.2008.271.

Ullmann, A. J., J. M. Aguado, S. Arikan-Akdagli, D. W. Denning, A. H. Groll, K. Lagrou, C. Lass-Flörl, R. E. Lewis, P. Muñoz, P. E. Verweij, A. Warris, F. Ader, M. Akova, M. C. Arendrup, R. A. Barnes, C. Beigelman-Aubry, S. Blot, E. Bouza, R. J. M. Bruggemann, D. Buchheidt, J. Cadranel, E. Castagnola, A. Chakrabarti, M. Cuenca-Estrella, G. Dimopoulos, J. Fortun, J. P. Gangneux, J. Garbino, W. J. Heinz, R. Herbrecht, C. P. Heussel, C. C. Kibbler, N. Klimko, B. J. Kullberg, C. Lange, T. Lehrnbecher, J. Löffler, O. Lortholary, J. Maertens, O. Marchetti, J. F. Meis, L. Pagano, P. Ribaud, M. Richardson, E. Roilides, M. Ruhnke, M. Sanguinetti, D. C. Sheppard, J. Sinko, A. Skiada, M. J. G. T. Vehreschild, C. Viscoli and O. A. Cornely (2018):

Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline.

Clinical Microbiology and Infection **24**: E1-E38. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.01.002.

Valdes, I. D., A. B. P. H. de Ruijter, C. J. Torres, J. C. A. Breuker, H. A. B. Wosten and H. de Cock (2020):

The sino-nasal warzone: transcriptomic and genomic studies on sino-nasal aspergillosis in dogs.

Npj Biofilms and Microbiomes **6**. DOI: ARTN 51
10.1038/s41522-020-00163-7.

Valdes, I. D., J. van den Berg, A. Haagsman, N. Escobar, J. F. Meis, F. Hagen, P. J. Haas, J. Houbraeken, H. A. B. Wosten and H. de Cock (2018):

Comparative genotyping and phenotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates from humans, dogs and the environment.

Bmc Microbiology **18**. DOI: ARTN 118
10.1186/s12866-018-1244-2.

Vallor, A. C., W. R. Kirkpatrick, L. K. Najvar, R. Bocanegra, M. C. Kinney, A. W. Fothergill, M. L. Herrera, B. L. Wickes, J. R. Graybill and T. F. Patterson (2008):

Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **52**: 2593-2598. DOI: 10.1128/Aac.00276-08.

van de Veerdonk, F. L., M. S. Gresnigt, L. Romani, M. G. Netea and J. P. Latge (2017a):

Aspergillus fumigatus morphology and dynamic host interactions.

Nature Reviews Microbiology **15**: 661-674. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.90.

van de Veerdonk, F. L., E. Kolwijck, P. P. Lestrade, C. J. Hodiament, B. J. Rijnders, J. van Paassen, P. J. Haas, C. Oliveira Dos Santos, G. A. Kampinga, D. C. Bergmans, K. van Dijk, A. F. de Haan, J. van Dissel, H. G. van der Hoeven, P. E. Verweij and G. Dutch Mycoses Study (2017b):

Influenza-Associated Aspergillosis in Critically Ill Patients.

Am J Respir Crit Care Med **196**: 524-527. DOI: 10.1164/rccm.201612-2540LE.

Vanderbeke, L., I. Spriet, C. Breynaert, B. J. A. Rijnders, P. E. Verweij and J. Wauters (2018):
Invasive pulmonary aspergillosis complicating severe influenza: epidemiology, diagnosis and treatment.

Curr Opin Infect Dis **31**: 471-480. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000504.

Vanderheyden, N. (1993):

Aspergillosis in Psittacine Chicks.

1993 Annual Conference - Association of Avian Veterinarians, Proceedings: 207-212.

Vanherberghen, M., F. Bureau, I. R. Peters, M. J. Day, C. Clercx and D. Peeters (2012):

Analysis of gene expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis: A transcriptomic analysis.

Veterinary Microbiology **157**: 143-151. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.12.009.

Vestweber, D. (2003):

Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins.

European Journal of Immunology **33**: 1361-1364. DOI: 10.1002/eji.200324011.

Vogel, K., M. Pierau, A. Arra, K. Lampe, D. Schlueter, C. Arens and M. C. Brunner-Weinzierl (2018):

Developmental induction of human T-cell responses against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*.

Scientific Reports **8**. DOI: ARTN 16904
10.1038/s41598-018-35161-5.

Voskamp, A. L., A. Gillman, K. Symons, A. Sandrini, J. M. Rolland, R. E. O'Hehir and J. A. Douglass (2015):

Clinical efficacy and immunologic effects of omalizumab in allergic bronchopulmonary aspergillosis.

J Allergy Clin Immunol Pract **3**: 192-199. DOI: 10.1016/j.jaip.2014.12.008.

Wan, Y. Y. (2014):

GATA3: a master of many trades in immune regulation.

Trends Immunol **35**: 233-242. DOI: 10.1016/j.it.2014.04.002.

Wang, D. Y., L. Hadj-Henni, S. Thierry, P. Arne, R. Chermette, F. Botterel, I. Hadrich, F. Makni, A. Ayadi, S. Ranque, W. Y. Huang and J. Guillot (2012):

Simple and Highly Discriminatory VNTR-Based Multiplex PCR for Tracing Sources of *Aspergillus flavus* Isolates.

Plos One **7**. DOI: ARTN e44204
10.1371/journal.pone.0044204.

Westphalen, K., G. A. Gusarova, M. N. Islam, M. Subramanian, T. S. Cohen, A. S. Prince and J. Bhattacharya (2014):

Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity.

Nature **506**: 503-506. DOI: 10.1038/nature12902.

Whiteside, S. K., J. P. Snook, Y. Ma, F. L. Sonderegger, C. Fisher, C. Petersen, J. F. Zachary, J. L. Round, M. A. Williams and J. J. Weis (2018a):

IL-10 Deficiency Reveals a Role for TLR2-Dependent Bystander Activation of T Cells in Lyme Arthritis.

Journal of Immunology **200**: 1457-1470. DOI: 10.4049/jimmunol.1701248.

Whiteside, S. K., J. P. Snook, M. A. Williams and J. J. Weis (2018b):

Bystander T Cells: A Balancing Act of Friends and Foes.

Trends in Immunology **39**: 1021-1035. DOI: 10.1016/j.it.2018.10.003.

Wilkinson, T. M., C. K. F. Li, C. S. C. Chui, A. K. Y. Huang, M. Perkins, J. C. Liebner, R. Lambkin-Williams, A. Gilbert, J. Oxford, B. Nicholas, K. J. Staples, T. Dong, D. C. Douek, A. J. McMichael and X. N. Xu (2012):

Preexisting influenza-specific CD4(+) T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans.

Nature Medicine **18**: 274-280. DOI: DOI 10.1038/nm.2612.

Windt, H., H. Kock, F. Runge, U. Hubel and W. Koch (2010):

Particle deposition in the lung of the Gottingen minipig.

Inhalation Toxicology **22**: 828-834. DOI: 10.3109/08958378.2010.485226.

Wurster, S., P. Weis, L. Page, J. Helm, M. Lazariotou, H. Einsele and A. J. Ullmann (2017):

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 **60**: 668-675. DOI: 10.1111/myc.12643.

Xiao, W., D. Y. Gong, B. Mao, X. M. Du, L. L. Cai, M. Y. Wang and J. J. Fu (2018):

Sputum signatures for invasive pulmonary aspergillosis in patients with underlying respiratory diseases (SPARED): study protocol for a prospective diagnostic trial.

Bmc Infectious Diseases **18**. DOI: ARTN 271
10.1186/s12879-018-3180-z.

Yates, R. M. and D. G. Russell (2005):

Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4.
Immunity **23**: 409-417. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.09.007.

Zelante, T., A. Y. Wong, T. J. Ping, J. Chen, H. R. Sumatoh, E. Vigano, Y. Hong Bing, B. Lee, F. Zolezzi, J. Fric, E. W. Newell, A. Mortellaro, M. Poidinger, P. Puccetti and P. Ricciardi-Castagnoli (2015):

CD103(+) Dendritic Cells Control Th17 Cell Function in the Lung.

Cell Rep **12**: 1789-1801. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.030.

Zhu, F., G. Ramadan, B. Davies, D. A. Margolis and C. A. Keever-Taylor (2008):

Stimulation by means of dendritic cells followed by Epstein-Barr virus-transformed B cells as antigen-presenting cells is more efficient than dendritic cells alone in inducing *Aspergillus* f16-specific cytotoxic T cell responses.

Clinical and Experimental Immunology **151**: 284-296. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03544.x.

Zielinski, C. E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2012):

Pathogen-induced human T(H)17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1 beta.

Nature **484**: 514-U139. DOI: 10.1038/nature10957.

Publikationsliste

Publikationen

Rosen, Ebner, Schmidt, Hartmann, Merle, Friese, Roesler (2019). Influence of Immune Status on the Airborne Colonization of Piglets with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Clonal Complex (CC) 398. *European Journal of Microbiology and Immunology*

Schmidt, Ebner, Rosen, Brakhage, Loeffler, Seif, Springer, Schlosser, Scharek-Tedin, Scheffold, Bacher, Köhl, Rösler, Hartmann (2020). The domestic pig as human-relevant large animal model to study adaptive anti-fungal immune responses against airborne *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Immunology*

Vorträge

Schmidt, Rosen, Rösler, Ebner, Hartmann. Porcine *Aspergillus*-specific CD4⁺ T cells for diagnosis of invasive Aspergillosis. 6th European Veterinary Immunology Workshop (5.-7. September 2018, Utrecht, Niederlande)

Schmidt, Rosen, Rösler, Kniemeyer, Ebner, Hartmann. The pig as model for human invasive pulmonary aspergillosis. 52. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V. (6.-8. September 2018, Innsbruck, Österreich)

Schmidt, Rosen, Rösler, Kniemeyer, Scharek-Tedin, Ebner, Hartmann. The pig as model for the antigen-specific immune response against airborne *Aspergillus fumigatus*. *Immunology of Fungal Infections - Gordon Research Seminar* (12.-13. Januar 2019, Galveston, Texas, USA)

Schmidt, Rosen, Rösler, Kniemeyer, Scharek-Tedin, Ebner, Hartmann. The pig as model for the antigen-specific immune response against airborne *Aspergillus fumigatus*. 53. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft e. V. (5.-7. September 2019, Mannheim, Deutschland)

Schmidt, Ebner, Rosen, Rösler, O. Kniemeyer, Seif, Löffler, Köhl, Scharek-Tedin, Hartmann. The pig as model for the pathogen-reactive immune response against airborne *Aspergillus fumigatus*. *Tagung des AK Veterinärimmunologie 2019* (9.-10. September 2019, München, Deutschland)

Poster

Stefanie Schmidt, Kerstin Rosen, Uwe Rösler, Olaf Kniemeyer, Lydia Scharek-Tedin, Friederike Ebner, Susanne Hartmann. The pig as model for the antigen-specific immune response against airborne *Aspergillus fumigatus*. *Gordon Research Conference, Immunology of Fungal Infections* (13.-18. Januar 2019, Galveston, Texas, USA)

Finanzierungsquellen

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (InfectControl 2020: Projekt ART4Fun [Teilprojekt 03ZZ0813D]).

Interessenskonflikte

Es besteht kein Interessenskonflikt durch die finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Susanne Hartmann für die Möglichkeit, dieses zukunftsweisende Forschungsprojekt innerhalb ihrer Arbeitsgruppe bearbeiten sowie im Rahmen nationaler und internationaler Kongresse vorstellen zu dürfen. Ich danke zudem für die stets konstruktive Diskussion meiner Daten.

Herzlichst danke ich Frederike, welche mich über die gesamte Zeit der Arbeit als direkte Ansprechpartnerin betreut hat. Ich danke für die Einführung in die Welt der immunologischen Forschung, die Hilfestellung bei der Planung und Durchführung der Versuche, das stete Feedback zu meinen Ergebnissen und letztlich das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Auch allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes – insbesondere Sebastian, Josephine und Lydia – möchte ich für den produktiven Austausch zu meinem Forschungsthema danken.

Ich bin zudem sehr dankbar für die Gesellschaft weiterer Doktoranden – Ankur, Benjamin, Bhavya, Christin, Gopinath, Hongwei, Katja, Lisa, Nicole, Norus und Yvet – während meiner Zeit am Institut. Auch euch danke ich für die konstruktiven Beiträge, die Unterstützung während der Versuche sowie das offene Ohr zu allen forschungsrelevanten oder privaten Belangen. Gemeinsam forscht es sich leichter.

Allen technischen Assistentinnen des Institutes – Beate, Bettina, Christiane, Marion und Yvonne – danke ich vielmals für die Einführung in die Arbeit im Labor, die Unterstützung während der arbeitsintensiven Wochen der Versuche sowie die Beantwortung aller meiner technischen Fragen.

Auch den Tierpflegern – Franziska R., Sebastian, Sven und Franziska L. – danke ich für die liebevolle Betreuung meiner Schweine und die tatkräftige Unterstützung bei allen Versuchen.

Als wesentliches Mitglied der Arbeitsgruppe möchte ich mich bei Michael R. für die herzliche Begrüßung im Team, die Hilfestellung bei allen organisatorischen Fragestellungen und die vielen Lebensweisheiten bedanken. Dein Humor erhellte auch die längsten Tage im Institut.

Prof. Dr. Uwe Rösler danke ich für die Möglichkeit, die an seinem Institut angesiedelte Aerosolkammer im Rahmen meiner Versuche nutzen zu dürfen. Insbesondere Dr. Anika Friese, Kerstin und Britta danke ich zudem für die technische Einführung in die Bedienung der Kammer und die Hilfestellung bei allen Expositionsversuchen.

Allen Mitgliedern des Verbundvorhabens „ART4FUN“ danke ich für den interdisziplinären Austausch und die Anregungen zu meiner Forschungsarbeit. Insbesondere Prof. Dr. Jürgen

Löffler, Dr. Michelle Seif und Dr. Olaf Kniemeyer danke ich für die Hilfestellung bei der Herstellung der Sporensuspensionen sowie der *Aspergillus*-Diagnostik.

Außerdem danke ich Dr. Anja Kühl für die gute Zusammenarbeit bei der Bearbeitung und Auswertung der histologischen Proben.

Allen voran danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die fortwährende Unterstützung, aufbauenden Worte und gelungenen Ablenkungen. Meinen Eltern danke ich von Herzen für den steten Rückhalt in meiner gesamten beruflichen Laufbahn. Eure aufopferungsvolle Liebe und Erziehung hat mich zu dem gemacht was ich heute bin. Meiner Schwester Patricia danke ich für die Gewissheit, dass ich all meine Sorgen und Gedanken mit jemandem teilen kann. Ohne dich wäre mein Leben zu jeder Zeit sehr viel einsamer gewesen. Ich bedanke mich zudem bei Sarah für die tiefgreifende Freundschaft, vorbehaltlose Toleranz und stets ehrlichen Worte. Bei dir muss ich mich niemals verstellen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Michael bedanken. Du hast mich in der Zeit stets aufgefangen, zum Lachen gebracht, mir zugehört oder warst einfach nur für mich da. Dein Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit ist daher unermesslich.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 02.12.2021

Stefanie Schmidt

Ort, Datum, Unterschrift



9 783967 291674

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-167-4