

TEXTE

72/2025

**Abschlussbericht**

# Erfassung gesundheitlicher Wirkungen durch Bioaerosole bei Schimmelbefall

**von:**

PD Dr. Udo Jäckel, Dr. Stefanie Klar, Jessica Reinert, Dr. Anja Wolff  
Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Berlin

**Herausgeber:**

Umweltbundesamt



TEXTE 75/2025

Ressortforschungsplan des Bundesministeriums für  
Umwelt, Naturschutz, nukleare Sicherheit und  
Verbraucherschutz

Forschungskennzahl 3718 62 234 0

FB001672

Abschlussbericht

## **Erfassung gesundheitlicher Wirkungen durch Bioaerosole bei Schimmelbefall**

von

PD Dr. Udo Jäckel, Dr. Stefanie Klar, Jessica Reinert, Dr.  
Anja Wolff

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Berlin

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

## Impressum

### Herausgeber

Umweltbundesamt  
Wörlitzer Platz 1  
06844 Dessau-Roßlau  
Tel: +49 340-2103-0  
Fax: +49 340-2103-2285  
[buergerservice@uba.de](mailto:buergerservice@uba.de)  
Internet: [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de)

### Durchführung der Studie:

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA)  
Nöldnerstraße 40-42  
10317 Berlin

### Abschlussdatum:

Oktober 2023

### Redaktion:

Fachgebiet II 1.4 Mikrobiologische Risiken  
Dr. Kerttu Valtanen

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Mai 2025

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

### **Danksagung**

Wir möchten uns beim Umweltbundesamt für die Möglichkeit der Bearbeitung sowie der Finanzierung des Projektes „Erfassung gesundheitlicher Wirkungen durch Bioaerosole bei Schimmelbefall“ bedanken. Zudem danken wir Frau Dr. Kerttu Valtanen für die fachliche Betreuung während des gesamten Projektvorhabens seitens des Umweltbundesamtes. Frau Jeanette Farshadi-Nejad und Frau Anne-Kathrin Liebschner aus dem Fachgebiet II 1.4 „Mikrobiologische Risiken“ danken wir für die Herstellung und Bereitstellung der Sporenlösungen. Der Gruppe 4.I.5 „Materialien und partikelförmige Gefahrstoffe“ von der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin danken wir für die Unterstützung bei der Etablierung des Versuchsaufbaus zur Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen.

### **Kurzbeschreibung: Erfassung gesundheitlicher Wirkungen durch Bioaerosole bei Schimmelbefall**

Feuchtebedingter Innenraumschimmel wird häufig mit dem Auftreten von gesundheitlichen Atemwegsbeschwerden in Verbindung gebracht. Kausale Zusammenhänge zwischen Belastung und Beanspruchung sind bislang unzureichend untersucht. Um relevante Gesundheitseffekte, z. B. durch Expositionen gegenüber luftgängigen Schimmelpilzbestandteilen, besser untersuchen zu können, bieten *in vitro* Testsysteme wie Lungenepithelzellen oder Air-Liquid-Interface Zellkulturen der Lunge möglicherweise einen geeigneten Ansatz. Das Ziel des Projektes war es, ein wirkungsbasiertes Testsystem zu etablieren, mit dem das inhalationstoxische Potential und die gesundheitlichen Auswirkungen gängiger Schimmelpilzarten feuchtegeschädigter Innenräume besser beurteilt werden können. Hierfür wurden Innenraum-spezifische Baumaterialien, Gipskarton und Raufasertapete sowie ein Schimmelpilz-spezifisches Nährmedium auf Agarbasis als Referenz mit den Schimmelpilzarten *Alternaria botrytis*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum* und *Stachybotrys chartarum* beimpft. Es wurden Extrakte aus den Schimmelpilz-bewachsenen Materialstücken (Materialextrakt), von der Materialoberfläche mittels eines Wattestäbchens (Oberflächenextrakt) oder aus luftgängigen Schimmelpilzbestandteilen der Materialstücke (Aerosolextrakt) gewonnen. Die zytotoxischen und immunmodulatorischen Wirkungen der Extrakte wurden mit der Lungenepithelzelllinie NuLi-1 und der differenzierten Monozytenzelllinie THP-1 untersucht. Die Zellviabilität wurde nach 24 Stunden und über 48 Stunden betrachtet. Zudem wurden die Zytokine Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) in NuLi-1 und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in THP-1-Makrophagen untersucht. Mit dem etablierten Testsystem konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Schimmelpilzarten und den verschiedenen Baumaterialien gezeigt werden. Dabei stimmten die Ergebnisse der Zellviabilität mit den Ergebnissen der GM-CSF- und IL-1 $\beta$  Analysen überein, wobei die GM-CSF-Konzentration mit zunehmender Zytotoxizität abnahm und die IL-1 $\beta$  Konzentration anstieg. Basierend auf den zytotoxischen und immunmodulatorischen Untersuchungen sowie der Daten aus den Experimenten mit Aerosolbildung kann eine akuttoxische Wirkung der luftgängigen Bestandteile von auf Baumaterialien kultivierter *Stachybotrys chartarum* Stämmen vermutet werden. Ob die Konzentrationen der Pilzbestandteile im Innenraum ausreichend sind, um gesundheitsschädigende Wirkungen in den Atemwegen der Exponierten auszulösen, ist bisher nicht bekannt.

### **Abstract: Assessment of Health Effects by Bioaerosols in Case of Mould**

Dampness-related indoor mould is often associated with the occurrence of respiratory health problems. Causal relationships between exposure and burden have not yet been sufficiently investigated. In order to better investigate relevant health effects, e.g. from exposures to airborne mould components, *in vitro* test systems such as lung epithelial cells or lung models may offer a suitable approach. The aim of the project was to establish an effect-based test system to better assess the inhalation-toxic potential and health effects of common mould species of damp-damaged indoor environments. For this purpose, indoor-specific building materials, plasterboard and woodchip wallpaper as well as a mould-specific agar-based culture medium as a reference were inoculated with the mould species *Alternaria botrytis*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium chrysogenum* and *Stachybotrys chartarum*. Extracts were obtained from the mould-grown pieces of material (material extract), from the surface of the material using a cotton swab (surface extract) or from airborne mould components of the pieces of material (aerosol extract). The cytotoxic and immunomodulatory effects of the extracts were investigated using the lung epithelial cell line NuLi-1 and the differentiated monocyte cell line THP-1. Cell viability was observed after 24 hours and over 48 hours. In addition, the cytokines granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in NuLi-1 and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in THP-1 macrophages

were examined. The established test system was able to show differences between the individual mould species and the different building materials. Thereby, the results of cell viability were in agreement with the results of GM-CSF and IL-1 $\beta$  analyses, whereby the GM-CSF concentration decreased with increasing cytotoxicity and the IL-1 $\beta$  concentration increased. Based on the cytotoxic and immunomodulatory studies and the data from the experiments with aerosol formation, an acute toxic effect of the airborne components of *Stachybotrys chartarum* strains cultivated on building materials can be suspected. It is unknown so far whether the indoor concentrations of mould components are sufficient to cause adverse health effects in the respiratory tract of the people exposed.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	12
Abkürzungsverzeichnis.....	13
Zusammenfassung.....	14
Summary.....	18
1 Einleitung und Projektziel.....	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Schimmelpilze, Sporensuspension und Extrakterstellung.....	23
2.1.1 Schimmelpilze.....	23
2.1.2 Sporen- und Partikelsuspensionen.....	23
2.1.2.1 Herstellung von Sporensuspensionen der Schimmelpilze.....	23
2.1.2.2 Vorbereitung der Sporensuspensionen für die Zellkulturversuche.....	24
2.1.2.3 Vorbereitung der Partikelsuspensionen für die Zellkulturversuche.....	24
2.1.3 Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien.....	24
2.1.3.1 Herstellung Schimmelpilz-bewachsener Materialien.....	24
2.1.3.2 Extraktionsmethode.....	27
2.1.3.3 Wiederfindung der Zellviabilität vom T-2 Toxin nach Extraktion von Baumaterial.....	27
2.1.3.4 Wiederfindung der Zellviabilität vom Satratoxin G nach Extraktion vom Filter.....	27
2.1.3.5 Mykotoxinextraktion.....	28
2.1.3.6 Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen.....	28
2.2 Zellkultur.....	30
2.2.1 Zelllinien.....	30
2.2.2 Kultivierung und Subkultivierung der humanen bronchialen Lungenepithelzelllinie NuLi-1.....	31
2.2.3 Kultivierung und Subkultivierung der monozytären THP-1 Zelllinie.....	31
2.2.4 Zellkulturversuche.....	31
2.2.4.1 Durchführung des Viabilitätstest.....	31
2.2.4.2 Morphologische Charakterisierung der Zellen nach Exposition.....	32
2.2.4.3 Impedimetrische Analyse.....	32
2.2.5 Bestimmung der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	33
2.3 Statistische Auswertung.....	34

3	Ergebnisse .....	35
3.1	Untersuchung der Schimmelpilz-Sporen .....	35
3.1.1	Morphologische Charakterisierung .....	35
3.1.2	Bestimmung des zytotoxischen Potentials .....	36
3.1.3	Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials.....	37
3.1.4	Bestimmung des zytotoxischen Potentials von inerten SiO <sub>2</sub> -Mikropartikeln.....	38
3.2	Untersuchung der Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien .....	39
3.2.1	Mykotoxinextraktion aus Baumaterialien .....	39
3.2.2	Bestimmung des zytotoxischen Potentials nach achtwöchiger Wachstumszeit .....	40
3.2.3	Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials nach achtwöchiger Wachstumszeit.....	43
3.2.4	Bestimmung des zytotoxischen Potentials nach vierwöchiger Wachstumszeit .....	44
3.2.5	Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials nach vierwöchiger Wachstumszeit.....	48
3.3	Untersuchung der Extrakte aus Oberflächenabstrichen von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien.....	49
3.3.1	Bestimmung der Sporenkonzentrationen der Oberflächenabstriche von Schimmelpilz-bewachsener Materialien.....	49
3.3.2	Bestimmung des zytotoxischen Potentials .....	50
3.3.3	Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials.....	54
3.4	Untersuchung der Aerosolisierung und der Extrakte aus aerosolisierten Schimmelpilzpartikeln.....	55
3.4.1	Mykotoxinextraktion aus Filter.....	55
3.4.2	Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Aerosolisierung von Schimmelpilzpartikeln .....	56
4	Diskussion .....	59
4.1	Gesundheitliche Wirkungen bei Schimmelbefall.....	59
4.1.1	Testsysteme .....	59
4.1.2	Zytotoxisches Potential von Schimmelpilzen.....	60
4.1.3	Immunmodulatorisches Potential von Schimmelpilzen .....	61
4.1.4	Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen.....	62
4.2	Risikobewertung der gesundheitlichen Wirkungen bei Schimmelbefall .....	63
A	Anhang .....	66
5	Quellenverzeichnis .....	70

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Graphischer Überblick zum Projektablauf mit den hergestellten Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien.....	15
Abbildung 2:	Häufigkeit von Schimmelpilzspezies in Innenräumen .....	21
Abbildung 3:	Schimmelpilz-bewachsene Gipskartonstücke nach achtwöchiger Wachstumszeit .....	25
Abbildung 4:	Schimmelpilz-bewachsene Raufasertapetenstücke nach achtwöchiger Wachstumszeit .....	26
Abbildung 5:	Schimmelpilz-bewachsene ME-Agarstücke nach achtwöchiger Wachstumszeit .....	26
Abbildung 6:	Versuchsaufbau zur Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien .....	30
Abbildung 7:	Prinzip der impedimetrischen Analyse mit ECIS® System.....	33
Abbildung 8:	Morphologie der Schimmelpilz-Sporen.....	35
Abbildung 9:	Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Sporensuspensionen der Schimmelpilze.....	37
Abbildung 10:	Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) im Zellkulturmedium nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Sporensuspensionen der Schimmelpilze.....	38
Abbildung 11:	Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von inerten SiO <sub>2</sub> -Mikropartikeln .....	39
Abbildung 12:	Zellviabilitäten von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von T-2 Toxinlösungen nach Aufbringung auf Baumaterialien Gipskarton und Raufasertapete .....	40
Abbildung 13:	Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach achtwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	41
Abbildung 14:	Zellmorphologie der NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien nach achtwöchiger Wachstumszeit .....	42
Abbildung 15:	Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) im Zellkulturmedium nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach achtwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	43
Abbildung 16:	Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	44

Abbildung 17:	Zellmorphologie der NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit .....	45
Abbildung 18:	Zeitaufgelöste Impedanzmessungen von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien mit vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	46
Abbildung 19:	Zellviabilitäten von NuLi-1 Zellen nach 48-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	47
Abbildung 20:	Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) im Zellkulturmedium nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien mit einer vierwöchigen Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz .....	48
Abbildung 21:	Sporenkonzentrationen nach Oberflächenabstrich von der bewachsenen Materialoberfläche in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	50
Abbildung 22:	Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	51
Abbildung 23:	Zeitaufgelöste Impedanzmessungen von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	52
Abbildung 24:	Zellmorphologie der NuLi-1 Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	53
Abbildung 25:	Zellviabilitäten der NuLi-1 Zellen nach 48-stündiger Exposition der Extrakte aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien .....	54
Abbildung 26:	Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) nach 24-stündiger Exposition der Extrakte aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien .....	55
Abbildung 27:	Zellviabilitäten von NuLi-1 Zellen nach Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Satratoxin G Lösungen nach Aufbringung auf Quarzfaserfiltern.....	56
Abbildung 28:	Partikelanzahlkonzentrationen in der Homogenisierungskammer während der Aerosolisierung ausgehend von feuchter und getrockneter mit <i>S. chartarum</i> CBS bewachsener Raufasertapete.....	57

Abbildung 29:	Zeitaufgelöster Verlauf der Partikelanzahlkonzentration von der Aerosolisierung von getrockneter mit <i>S. chartarum</i> CBS bewachsener Raufasertapete.....	58
Abbildung 30:	Größenverteilung der freigesetzten Partikel während der Aerosolisierung von getrockneter mit <i>S. chartarum</i> CBS bewachsener Raufasertapete.....	58
Abbildung 31:	Aktivierung der Inflammasom-assoziierten Caspase-1 und Freisetzung von IL-1 $\beta$ in Makrophagen .....	62
Abbildung 32:	Eindringtiefe in die Atemwege in Abhängigkeit von der Partikelgröße .....	64
Abbildung 33:	Zeitaufgelöste Widerstandsmessungen von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	66
Abbildung 34:	Zeitaufgelöste Kapazitätsmessungen von NuLi-1 nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	67
Abbildung 35:	Zeitaufgelöste Widerstandsmessungen von NuLi-1 nach Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	68
Abbildung 36:	Zeitaufgelöste Kapazitätsmessungen von NuLi-1 nach Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz.....	69

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Schimmelpilze .....	23
Tabelle 2:	Verwendete Zelllinien.....	30
Tabelle 3:	Sporengrößen .....	36
Tabelle 4:	Sporenkonzentrationen der Oberflächenabstriche von Schimmelpilz-bewachsener Materialien .....	49

## Abkürzungsverzeichnis

<b><i>A. botrytis</i></b>	<i>Alternaria botrytis</i>
<b>AECBM</b>	Airway Epithelial Cell Basal Medium
<b>ALI</b>	Air-Liquid-Interface
<b>AUC</b>	Fläche unter der Kurve (engl. area under the curve)
<b><i>A. versicolor</i></b>	<i>Aspergillus versicolor</i>
<b>DO-Na-S-S</b>	Diocetyl-Natrium-Sulfosuccinat
<b>ECIS®</b>	Electric cell-substrate impedance sensing
<b>ELISA</b>	enzymgekoppelter Immunoassay (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
<b>IL-1β</b>	Interleukin-1β
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>ME-Agar</b>	Malzextrakt-Agar
<b>OAS</b>	optisches Aerosolspektrometer (engl. optical aerosol spectrometer)
<b><i>P. chrysogenum</i></b>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>rpm</b>	Runden pro Minute (engl. rounds per minute)
<b><i>S. chartarum</i></b>	<i>Stachybotrys chartarum</i>
<b>SiO<sub>2</sub>-Partikel</b>	Silica-Partikel
<b>TRBA</b>	Technische Regel biologischer Arbeitsstoffe
<b>WT</b>	Wildtyp

## Zusammenfassung

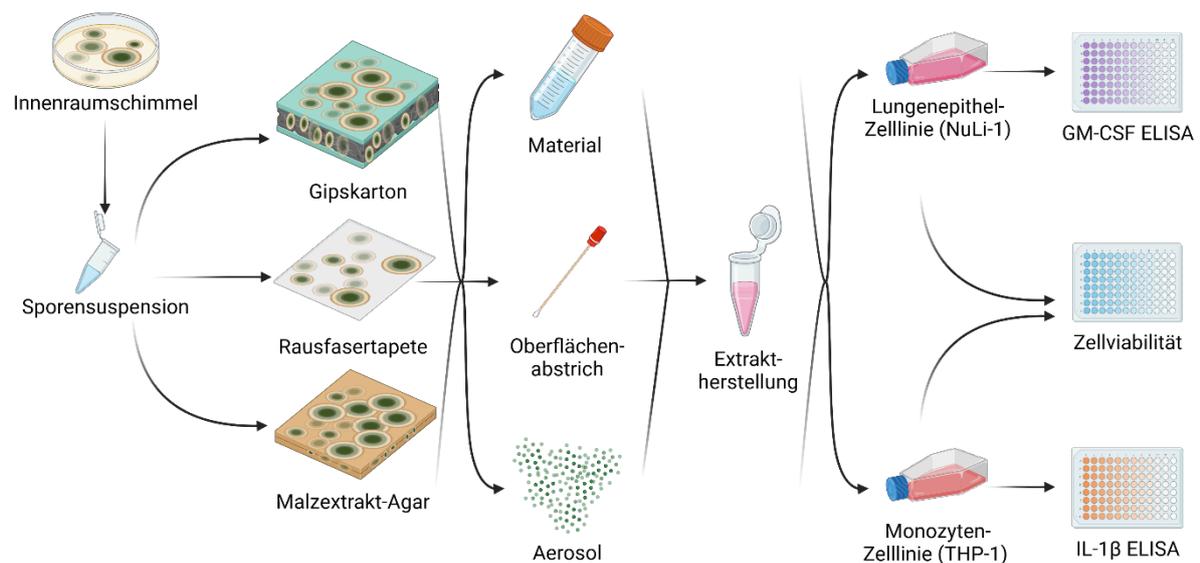
### Einleitung

Feuchtebedingter Innenraumschimmel ist ein weltweit vorkommendes Problem. Dieser wird häufig mit dem Auftreten von respiratorischen und allergischen Symptomen in einen Zusammenhang gebracht, da diese häufig bei Bewohnern von Schimmelpilz-belasteten Innenräumen beobachtet wurden. Dies lässt vermuten, dass in solchen Szenarien eine kontinuierliche Exposition gegenüber luftgängigen Schimmelpilzpartikeln, wie Sporen und Myzelbruchstücken, das Risiko von Atemwegserkrankungen und -irritationen erhöhen kann. Der kausale Zusammenhang zwischen einer inhalativen Schimmelpilzexposition und dem Auftreten einer gesundheitlichen Schädigung der Atemwege konnte bisher aufgrund fehlender Dosis-Wirkungs-Beziehungen jedoch noch nicht gezeigt werden. Um den Wissensstand auf diesem Gebiet zu erweitern, war das Ziel dieses Forschungsvorhabens die Entwicklung eines *in vitro* Testsystems zur Beurteilung der inhalationstoxischen Wirkungen, die von Innenraum-relevanten Schimmelpilzen, insbesondere deren Bioaerosolen, ausgehen können.

### Methodik

Für das *in vitro* Testsystem wurde die Lungenepithelzelllinie NuLi-1 sowie die differenzierte monozytäre Zelllinie THP-1 verwendet, woran das zytotoxische als auch immunmodulatorische Potential ausgehend von fünf Innenraum-relevanten Schimmelpilzen bestimmt wurden. Es wurden die Schimmelpilze *Alternaria botrytis* (*A. botrytis*), *Aspergillus versicolor* (*A. versicolor*), *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*), *Stachybotrys chartarum* CBS (*S. chartarum* CBS) und *Stachybotrys chartarum* WT (*S. chartarum* WT) untersucht. Das zytotoxische und immunmodulatorische Potential wurde von deren Schimmelpilzsporen sowie von Extrakten aus Proben von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien bestimmt. Für die Herstellung Schimmelpilz-bewachsener Materialien wurden Innenraum-typische Baumaterialien Gipskarton und Raufasertapete im Vergleich zu einem Malzextrakt-Agar (ME-Agar) als Referenzmaterial verwendet. Die Materialien wurden mit Sporensuspensionen der Schimmelpilze inokuliert und für eine Wachstumszeit von vier bzw. acht Wochen unter optimierten Bedingungen inkubiert. Als Kontrolle wurden die gleichen Materialien mit sterilem Phosphatpuffer (PBS) behandelt. Von den bewachsenen Materialien wurden Extrakte mit einer zuvor etablierten Methode hergestellt, um Mykotoxine als toxischen Bestandteil der Schimmelpilze zu extrahieren und deren zytotoxisches und immunmodulatorisches Potential zur Beurteilung der inhalationstoxischen Wirkungen der Schimmelpilze zu untersuchen. Wie in der Abbildung 1 dargestellt ist, wurden Extrakte untersucht, die auf drei verschiedenen Wegen aus dem Material gewonnen wurden: gesamtes Materialstück, Oberflächenabstrich und Bioaerosol. Die Erfassung des zytotoxischen Potentials erfolgte über die Bestimmung der Zellviabilität, der Zellmorphologie und der Impedanz der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Exposition der Zellen mit Sporensuspensionen oder Schimmelpilzextrakten. Die Erfassung des immunmodulatorischen Potentials der Proben erfolgte durch eine Konzentrationsbestimmung der proinflammatorischen Zytokine Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) aus den Lungenepithelzellen und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aus den Makrophagen nach Exposition.

**Abbildung 1: Graphischer Überblick zum Projektablauf mit den hergestellten Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien**



Quelle: eigene Darstellung (erstellt mit Biorender.com), Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

## Ergebnisse

### a) Schimmelpilzsporen

Zu Beginn wurde das zytotoxische und immunmodulatorische Potential, das von Sporensuspensionen der Schimmelpilze ausgehen kann, untersucht. Die Ergebnisse zeigten Verluste der Zellviabilitäten und veränderte Zytokinfreisetzungen in Abhängigkeit der Sporenkonzentrationen der Schimmelpilze *A. botrytis*, *A. versicolor* und *S. chartarum* CBS. Um einen möglichen Viabilitätsverlust und somit zytotoxische Wirkungen durch einen rein physikalischen Effekt der Sporen zu untersuchen, wurde der Einfluss von inerten Silica-Partikeln in ähnlichen Größen bzgl. Oberflächen entsprechend der untersuchten Schimmelpilz-Sporen auf die Zellviabilität der Lungenepithelzellen und Makrophagen bestimmt. Diese Ergebnisse zeigten einen geringen Einfluss der Silica-Partikelsuspensionen in Abhängigkeit der Konzentration. Um dennoch einen Viabilitätsverlust durch Partikeleffekte zu umgehen und auch eine mögliche Auskeimung der Sporen, die in den Versuchen beobachtet wurden, auszuschließen, wurden in weiterführenden Untersuchungen verschiedene Proben aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien gesammelt und daraus Extrakte hergestellt.

### b) Extraktproben

Im ersten Ansatz wurden Extrakte aus dem gesamten Schimmelpilz-bewachsenen Materialstück gewonnen und anschließend der Einfluss der Extrakte auf die Zellviabilität und Zytokinfreisetzung untersucht. Eine vorgeschaltete Analyse, mit der Fragestellung, ob die Wachstumszeit der Schimmelpilze auf den Materialien eine Rolle spielt, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Somit wurden für alle Untersuchungen Materialien verwendet, auf denen die Schimmelpilze vier Wochen gewachsen waren. Bei der Untersuchung der Gesamtmaterialieextrakte konnten nur im Falle der *S. chartarum* (Gipskarton, Raufasertapete, ME-Agar) und der *P. chrysogenum* (ME-Agar) bewachsenen Materialien eine Reduktion der Zellviabilität und eine Änderung der Zytokinfreisetzung gemessen werden. Der negative Einfluss

der Extrakte wurde ebenso morphologisch durch veränderte Zellformen und/oder lückenhafte Zellschichten sowie durch eine verringerte Impedanz der Zellen deutlich. Neben den zytotoxischen Wirkungen änderte sich bei diesen Extrakten ebenfalls die Zytokinfreisetzung im Vergleich zu den Kontrollextrakten, resultierend in einer verringerten Freisetzung von GM-CSF aus den Lungenepithelzellen sowie in einer vermehrten IL-1 $\beta$  Freisetzung aus den Makrophagen. Zusätzlich zu den Unterschieden zwischen verschiedenen Schimmelpilzspezies wurden Unterschiede zwischen den beiden *S. chartarum* Stämmen festgestellt. Das Extrakt aus den mit *S. chartarum* WT bewachsene ME-Agar zeigte eine geringere Viabilitätsreduktion in den Makrophagen als das Extrakt aus *S. chartarum* CBS.

In einem zweiten Ansatz wurden Extrakte aus Oberflächenabstrichen der mit den Schimmelpilzen *A. versicolor*, *P. chrysogenum* und *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien untersucht. Diese zeigten ebenfalls eine Viabilitätsreduktion sowie verringerte GM-CSF und erhöhte IL-1 $\beta$  Konzentrationen nach der Exposition der Zellen gegenüber den Extrakten aus Oberflächenabstrichen der mit *S. chartarum* bewachsenen Materialien sowie der Extrakte aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar. Die Viabilitätsreduktion der Zellen war nach der Exposition gegenüber den Extrakten aus den Oberflächenabstrichen der bewachsenen Materialien jedoch geringer als nach der Exposition der Extrakte aus den gesamten bewachsenen Materialien. Die zytotoxischen und immunmodulatorischen Wirkungen können bei *S. chartarum* durch deren produzierten Mykotoxine, die Trichothecene Typ D, hervorgerufen werden. Diese hemmen die Proteinbiosynthese, weshalb proteinogene Zytokine, wie GM-CSF, möglicherweise nicht mehr produziert werden. Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass Trichothecene Typ D apoptotische Signalwege in Makrophagen aktivieren und zu einer erhöhten IL-1 $\beta$  Freisetzung durch Aktivierung des Caspase1-vermittelten Inflammasoms führen können. Bei der Untersuchung der Extrakte aus den Oberflächenabstrichen konnten ebenfalls Unterschiede zwischen den bewachsenen Materialien gezeigt werden. So zeigte sich eine unterschiedliche Impedanz der Lungenepithelzellen nach deren Exposition gegenüber Extrakten aus den Oberflächenabstrichen von Gipskarton und Raufasertapete, die mit *S. chartarum* CBS bewachsen waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Abhängigkeit des Materials möglicherweise verschiedene Mykotoxinarten und -konzentrationen produziert werden. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass sich auch die Sporenkonzentrationen von *S. chartarum* CBS auf den unterschiedlichen Materialien unterscheiden.

In einem dritten Ansatz wurde untersucht, ob Schimmelpilzpartikel von *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien in die Luft gelangen können. Dazu wurde ein Versuchsaufbau für die Freisetzung von Schimmelpilzbestandteilen von der Schimmelpilz-bewachsenen Materialoberfläche und eine Sammelmethode zur Extrakterstellung etabliert. Die Partikelfreisetzung wurde mittels eines optischen Aerosolspektrometers analysiert und die luftgängigen Partikel auf Quarzfaserfiltern für Extrakterstellung gesammelt. Die optische Partikelanalyse während der Aerosolisierung von getrockneten mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Raufasertapetenstücken zeigte, dass überwiegend Partikel mit einem optischen Latex-Äquivalenzdurchmesser von 0,3  $\mu\text{m}$  bis 4,1  $\mu\text{m}$  freigesetzt wurden. Die freigesetzten Partikel können jedoch aufgrund ihrer Größe bis in die unteren Atemwege und sogar in die tiefen Regionen der Atemwege, die Lungenalveolen, eindringen. Die hergestellten Extrakte zeigten eine zytotoxische Wirkung bei beiden Zelllinien, was nachweist, dass die etablierte Sammel- und Extraktionsmethode geeignet ist, um die toxischen Wirkungen aus Bioaerosolen zu untersuchen. Der Ansatz zeigte außerdem, dass von Bioaerosolen, die Bestandteile von *S. chartarum* CBS enthalten, eine zytotoxische Wirkung und somit ein potenzielles Gesundheitsrisiko für den Menschen ausgehen kann.

## **Fazit**

Zusammenfassend wurde in diesem Forschungsvorhaben ein *in vitro* Testsystem entwickelt, mit dem zytotoxische und immunmodulatorische Unterschiede zwischen den untersuchten Schimmelpilzspezies, -stämmen und Materialien gemessen werden konnten. Vom Schimmelpilz *S. chartarum* CBS wurden akut toxische Wirkungen in material- als auch luftgetragener Form mit dem entwickelten Testsystem nachgewiesen, die auch mit einer veränderten Zytokinfreisetzung assoziiert sind. Ob die Konzentrationen an freigesetzten Schimmelpilzpartikeln in Innenräumen ausreichend sind, um gesundheitsschädliche Wirkungen in den Atemwegen des Menschen auszulösen, ist nicht bekannt und erfordert weitere Forschung. In weiterführenden Untersuchungen sollte daher eine qualitative und quantitative Bestimmung der Mykotoxinkonzentration integriert werden, um Dosis-Wirkungs-Beziehungen herstellen zu können und einen kausalen Zusammenhang zwischen inhalativer Schimmelpilzexposition und auftretenden gesundheitsschädigenden Wirkungen nachweisen zu können.

## Summary

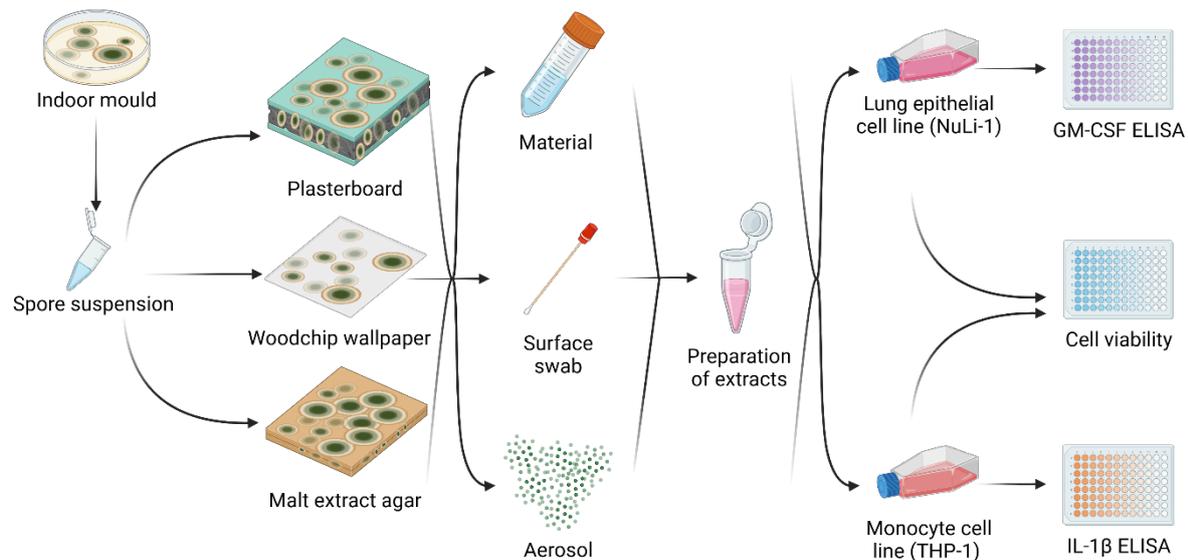
### Introduction

Dampness-related indoor mould is a worldwide problem. It is often associated with the occurrence of respiratory and allergic symptoms, since these have frequently been observed in occupants of mould-exposed indoor environments. This suggests that in such scenarios, continuous exposure to airborne mould particles, such as spores and mycelial fragments, may increase the risk of respiratory disease and irritation. However, the causal relationship between inhalation exposure to mould and the occurrence of respiratory health effects has not yet been demonstrated due to a lack of dose-response correlations. In order to extend the knowledge in this field, the aim of this research project was to develop an *in vitro* test system for assessing the inhalation-toxic effects that can arise from indoor relevant moulds, especially their bioaerosols.

### Methods

For the *in vitro* test system, the lung epithelial cell line NuLi-1 and the differentiated monocytic cell line THP-1 were used to determine the cytotoxic and immunomodulatory potential of five indoor relevant moulds. The moulds *Alternaria botrytis* (*A. botrytis*), *Aspergillus versicolor* (*A. versicolor*), *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*), *Stachybotrys chartarum* CBS (*S. chartarum* CBS) and *Stachybotrys chartarum* WT (*S. chartarum* WT) were investigated. The cytotoxic and immunomodulatory potential was determined from their mould spores as well as from extracts from samples of mould grown materials. For the preparation of mould grown materials, the common building materials plasterboard and woodchip wallpaper were used in comparison to a malt extract agar (ME-Agar) as reference material. The materials were inoculated with spore suspensions of the moulds and incubated for a growth period of four or eight weeks under optimised conditions. As a control, the same materials were treated with sterile phosphate buffer (PBS). Extracts were prepared from the overgrown materials using a previously established method to extract mycotoxins as a toxic component of moulds and to investigate their cytotoxic and immunomodulatory potential to assess the inhalation toxic effects of moulds. As shown in Figure 1, extracts obtained from the material by three different ways were investigated: whole piece of material, surface swab and bioaerosol. The cytotoxic potential was assessed by determining cell viability, cell morphology and impedance of cells at different time points after exposure of the cells to spore suspensions or mould extracts. The immunomodulatory potential of the samples was assessed by determining the concentration of the proinflammatory cytokines granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) from the lung epithelial cells and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) from the macrophages after exposure.

**Figure 1: Graphical overview of the project procedure with the prepared extracts from mould-grown material**



Source: created with Biorender.com, own Presentation, Federal Institute for Occupational Safety and Health

## Results

### a) Mould spores

Initially, the cytotoxic and immunomodulatory potential that may originate from spore suspensions of moulds was investigated. The results showed a loss of cell viability and changed cytokine releases depending on the spore concentrations of the moulds *A. botrytis*, *A. versicolor* and *S. chartarum* CBS. To investigate a possible loss of viability and thus cytotoxic effects due to a physical effect of the spores, the influence of inert silica particles of similar sizes or surfaces corresponding to the mould spores on the cell viability of lung epithelial cells and macrophages was determined. These results showed only a slight influence of the silica particle suspensions depending on the concentration. Nevertheless, in order to avoid a loss of viability due to particle effects and also to exclude a possible germination of the spores observed in the experiments, various samples were collected from mould grown materials and extracts were prepared from them in further investigations.

### b) Extract samples

In the first approach, extracts were obtained from the complete mould grown material and then the influence of the extracts on cell viability and cytokine release was investigated. A preliminary analysis to determine whether the growth time of the moulds on the materials plays a role showed no significant differences. Thus, for all investigations materials with a growth time of four weeks were used. In the investigation of the total material extracts, a reduction in cell viability and a change in cytokine release could only be measured in the case of the *S. chartarum* (plasterboard, woodchip wallpaper, ME-Agar) and the *P. chrysogenum* (ME-Agar) covered materials. The negative influence of the extracts was also evident morphologically through altered cell shapes and/or incomplete cell layers as well as through a reduced impedance of the cells. In addition to cytotoxic effects, cytokine release was also altered in these extracts compared to control extracts, resulting in decreased release of GM-CSF from lung epithelial cells and increased IL-1 $\beta$  release from macrophages. In addition to the differences between different mould species, differences were found between the two *S. chartarum* strains. The extracts from

ME-Agar grown with *S. chartarum* WT showed a lower viability reduction in macrophages than the extracts from *S. chartarum* CBS.

In a second approach, extracts from surface swabs of the materials overgrown with the moulds *A. versicolor*, *P. chrysogenum* and *S. chartarum* CBS were examined. These also showed a viability reduction as well as decreased GM-CSF and increased IL-1 $\beta$  concentrations after exposure of the cells to extracts from surface swabs of the materials grown with *S. chartarum* as well as the extracts from surface swabs of the ME-Agar grown with *P. chrysogenum*. However, the reduction of cell viability was lower after exposure to the extracts from the surface swabs of the overgrown materials than after exposure to the extracts from the entire overgrown materials. The cytotoxic and immunomodulatory effects may be caused in *S. chartarum* by their produced mycotoxins, the trichothecenes type D. These inhibit protein biosynthesis, which may result in the loss of proteinogenic cytokines such as GM-CSF. Furthermore, it has already been described that trichothecenes type D can activate apoptotic signalling pathways in macrophages and lead to increased IL-1 $\beta$  release through activation of the caspase1-mediated inflammasome. The analysis of the extracts from the surface swabs also revealed differences between the overgrown materials. So, a different impedance of the lung epithelial cells was shown after exposure to the extracts from surface swabs of plasterboard and woodchip wallpaper grown with *S. chartarum* CBS. These results suggest that different types and concentrations of mycotoxins may be produced depending on the material. This assumption is confirmed by the fact that the spore concentration of *S. chartarum* CBS, and thus possibly the mycotoxin concentration, also differed on the different materials, resulting in different cell viability.

In a third approach, it was investigated whether mould particles from *S. chartarum* CBS grown materials can become airborne. For this purpose, an experimental set-up was established for the release of mould components from the mould grown material surface and a collection method for extract preparation. The particle release was analysed using an optical aerosol spectrometer and the airborne particles were collected on quartz fibre filters for extract preparation. Optical particle analysis during aerosolisation of dried pieces of woodchip wallpaper covered with *S. chartarum* CBS showed that particles with an optical latex equivalent diameter from 0.3  $\mu\text{m}$  to 4.1  $\mu\text{m}$  are predominantly released. However, due to their size, such particles can penetrate into the lower respiratory tract and even into the deep regions of the respiratory tract, the alveoli of the lungs. The extracts produced showed a cytotoxic effect in both cell lines, proving that the established collection and extraction method is suitable for investigating the cytotoxic effects from bioaerosols. In addition, the results show that not only spores but also smaller particles of the moulds have a toxic potential. The approach also showed that bioaerosols containing components of *S. chartarum* CBS can have a cytotoxic effect and thus pose a potential health risk to humans.

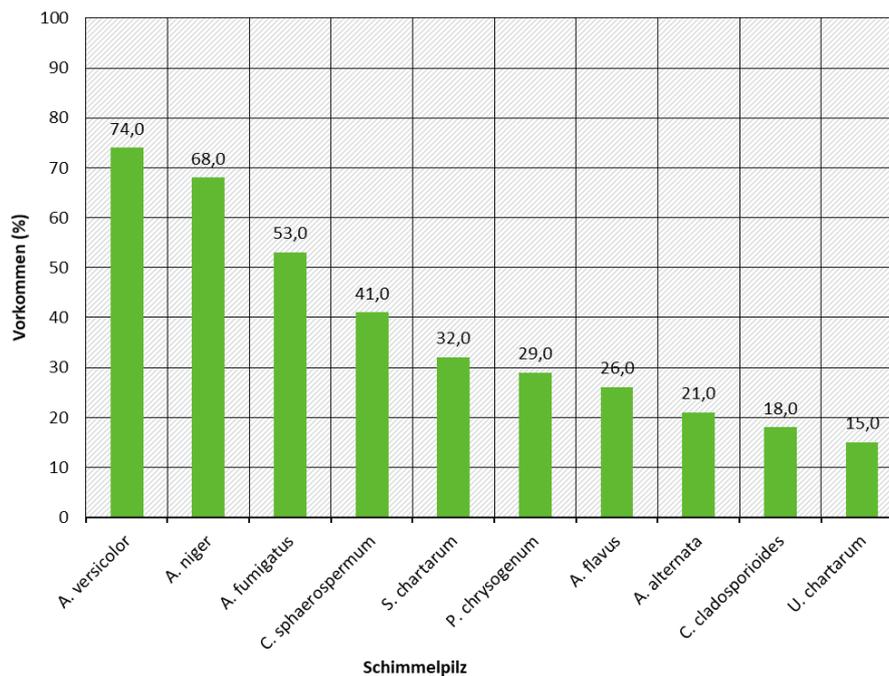
## Conclusion

In summary, an *in vitro* test system was developed in this research project that could measure cytotoxic and immunomodulatory differences between the mould species, strains and materials investigated. Acute toxic effects of the mould *S. chartarum* CBS in material and airborne form were detected with the developed test system, which are also associated with an altered cytokine release. Whether the concentrations of released mould particles indoors are sufficient to cause adverse health effects in the human respiratory tract is not known and requires further research. In further studies, a qualitative and quantitative determination of the mycotoxin concentration should therefore be integrated in order to be able to establish dose-response relationships and to be able to prove a causal relationship between inhalative mould exposure and occurring adverse health effects.

## 1 Einleitung und Projektziel

Feuchtebedingter Innenraumschimmel ist ein weltweit auftretendes Problem. Bis zu 21 % der Wohnungen in Europa, bis zu 27 % in Nordeuropa, bis zu 47 % in Amerika, bis zu 12 % in China sowie zwischen 12 % und 78 % in Neuseeland sind von Innenraumschimmel im Zusammenhang mit Feuchteschäden betroffen (Coulburn & Miller, 2022). Auch an Arbeitsplätzen, bei denen Tätigkeiten mit organischen Materialien durchgeführt werden, wie in Getreidelagern (Ndaw et al., 2021) oder Abfallverwertungsanlagen (Schlosser et al., 2020) kann vermehrt Schimmel auftreten (Viegas et al., 2018). Unter „Schimmel“ versteht man die Besiedlung von Materialien oder Inventar mit Schimmelpilzen, Bakterien oder anderen Mikroorganismen. Alle Materialien, die einen hohen Anteil an organischen Substanzen und eine erhöhte Feuchte aufweisen, können in der Regel von Mikroorganismen bewachsen werden. Schimmelpilze sind hierbei von großem Interesse. Sie werden auch als Fadenpilze bezeichnet, da sie in ihrer Wachstumsphase Zellfäden, die Hyphen, ausbilden, deren Gesamtheit als Myzel bezeichnet wird. Zudem bilden sie zur Verbreitung Sporen aus (Umweltbundesamt, 2017). Um einen Überblick über auftretende Schimmelpilze in Innenräumen zu erhalten, sind in Abbildung 2 die zehn häufigsten Schimmelpilzspezies aus 34 publizierten *in situ* Studien aus den letzten 21 Jahren dargestellt. Sie gehören zu den Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Alternaria*, *Cladosporium* und *Ulocladium* (Al Hallak et al., 2023).

**Abbildung 2: Häufigkeit von Schimmelpilzspezies in Innenräumen**



*Aspergillus versicolor* (*A. versicolor*), *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), *Cladosporium sphaerospermum* (*C. sphaerospermum*), *Stachybotrys chartarum* (*S. chartarum*), *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*), *Aspergillus flavus* (*A. flavus*), *Alternaria alternata* (*A. alternata*), *Cladosporium cladosporioides* (*C. cladosporioides*), *Ulocladium chartarum* (*U. chartarum*)

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Daten aus (Al Hallak et al., 2023)

Das Vorkommen von Innenraumschimmel im Zusammenhang mit Feuchteschäden wird häufig mit dem Auftreten von Symptomen, wie Keuchen und Husten, bei Bewohnern in Verbindung gebracht (Antova et al., 2008; Mendell et al., 2011). Dies deutet darauf hin, dass eine kontinuierliche inhalative Exposition gegenüber Schimmelpilzen das Risiko von

respiratorischen und allergischen Erkrankungen wie Asthma erhöhen könnte (Sahakian et al., 2008; World Health Organization. Regionalbüro für Europa, 2009). Es ist zwar bekannt, dass von bestimmten Schimmelpilzarten infektiöse, allergische und toxische Wirkungen ausgehen können (Hardin et al., 2003), doch bisher konnte aufgrund fehlender Dosis-Wirkungs-Beziehungen und epidemiologischer Studien keine Kausalität zwischen inhalativen Schimmelpilzexpositionen und gesundheitlichen Auswirkungen in den bezeichneten Innenräumen nachgewiesen werden (Mendell et al., 2011; Walser et al., 2015). Eine mögliche Ursache für die gesundheitlichen Wirkungen von den beobachteten entzündlichen Prozessen der oberen Atemwege und der Lunge werden hier im Zusammenhang mit auftretenden Bioaerosolen vermutet, deren Quellen feuchteschädigte Baumaterialien sind (Walser et al., 2015). Nach Wachstum und Vermehrung der Schimmelpilze auf Baumaterialien können sie unter bestimmten Bedingungen luftgetragene Partikel, wie Sporen oder Hyphenfragmente, in die Innenraumluft abgeben. Diese tragen zur Verschlechterung der Innenraumqualität bei, wodurch gesundheitsschädigende Wirkungen durch Inhalation toxischer Stoffwechselprodukte (Metabolite), wie Mykotoxine, beim Menschen auftreten können (Al Hallak et al., 2023). Bei gesunden Menschen mit funktionierender Lunge und Immunsystem werden die freigesetzten Schimmelpilzbestandteile nach Inhalation meist in der Schleimschicht an den Epitheloberflächen der Atemwege gefangen und durch die mukoziliäre Clearance, dem Selbstreinigungsprozess der Atemwege, entfernt oder durch Alveolarmakrophagen phagozytiert und eliminiert. Bei einer geschädigten mukoziliären Clearance, möglicherweise durch eine chronische Schimmelpilzexposition, können die Partikel an die Epithelzellen der Atemwege haften. Bei einer Aufnahme der Sporen durch die Epithelzellen können diese bei Auskeimung Zellschädigungen hervorrufen (Øya et al., 2019).

Bisher gibt es zur Beurteilung der gesundheitlichen Wirkungen von Schimmelpilzen und deren Bioaerosolen sowie zur Festlegung von Grenzwerten für gesundheitsschädigende Wirkungen kein valides Testsystem. Da die Ergebnisse bisheriger Dosis-Wirkungs-Untersuchungen an Tiermodellen aufgrund unterschiedlicher Anatomie schwer auf den Menschen übertragbar sind (Creasia et al., 1990; Movia et al., 2020), stellen *in vitro* Zellsysteme wie Lungenepithelzellen oder Lungenmodelle einen möglichen geeigneten Ansatz dar, um humanrelevante gesundheitliche Effekte, z.B. nach Schimmelpilzexposition, zu untersuchen (Zscheppang et al., 2018). Das Ziel dieses Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines wirkungsbasierten Testsystems zur Erfassung und Beurteilung der gesundheitlichen Wirkungen von durch Schimmelbefall hervorgerufenen Bioaerosolpartikel. Dabei sollten verschiedene für Innenraumschäden typische und gesundheitlich relevante Schimmelpilze auf ihr zytotoxisches und immunmodulatorisches Potential an einem *in vitro* Modell untersucht werden. Hierfür sollten Lungenepithelzellen und Makrophagen verwendet werden, um inhalative als auch immunologische Wirkungen zu erfassen. Um potenzielle Schimmelpilzbestandteile zu untersuchen, die im Bioaerosol vorkommen, wurden zuvor Untersuchungen an Sporen sowie Extrakten aus bewachsenen Baumaterialien durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Schimmelpilze, Sporensuspension und Extrakterstellung

#### 2.1.1 Schimmelpilze

Im Rahmen des Projektes wurden fünf Schimmelpilze aus der Stammsammlung des Umweltbundesamtes (Fachgebiet II 1.4 Mikrobiologische Risiken) verwendet. Darunter sind vier verschiedene Schimmelpilzspezies: *Alternaria botrytis* (*A. botrytis*), *Aspergillus versicolor* (*A. versicolor*), *Penicillium chrysogenum* (*P. chrysogenum*) und *Stachybotrys chartarum* (*S. chartarum*), wobei vom *S. chartarum* zwei verschiedene Stämme untersucht wurden: *Stachybotrys chartarum* CBS (*S. chartarum* CBS), *Stachybotrys chartarum* Wildtyp (*S. chartarum* WT). *A. versicolor* stammte aus einem Ringversuch und *S. chartarum* WT wurde aus einem schimmelbelasteten Gebäude in Berlin isoliert. Jedem Pilzstamm wurde zu Identifizierungszwecken eine Stammbezeichnung zugeordnet, die in der Tabelle 1 aufgelistet sind.

**Tabelle 1: Verwendete Schimmelpilze**

Schimmelpilze	Stammbezeichnung
<i>A. botrytis</i>	CBS 197.67
<i>A. versicolor</i>	MR-393-17
<i>P. chrysogenum</i>	CBS 306.48
<i>S. chartarum</i> CBS	CBS 182.80
<i>S. chartarum</i> WT	MR-386-17

#### 2.1.2 Sporen- und Partikelsuspensionen

##### 2.1.2.1 Herstellung von Sporensuspensionen der Schimmelpilze

Die Sporensuspensionen der fünf Schimmelpilzstämmen wurden von der Fachgruppe II 1.4 „Mikrobiologische Risiken“ des Umweltbundesamtes folgendermaßen hergestellt. Nach 14-tägiger Kultivierung bei 25 °C wurden die Sporen der Pilzstämmen von jeweils 50 Kartoffelextrakt-Glukose-Agarplatten (Thermo Fisher Diagnostics GmbH) unter Verwendung einer sterilen 0,05 %-igen Diocetyl-Natriumsulfosuccinat-Lösung (DO-Na-S-S-Lösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) geerntet. Hierzu wurden die bewachsenen Agarplatten zunächst mit 3 ml der DO-Na-S-S-Lösung abgeschwemmt und über deren Oberfläche mit einer Impföse gestrichen. Anschließend erfolgte eine Filtration der entstandenen Suspension über eine mit Glaswolle gefüllte sterile Spritze, um Myzelbruchstücke und Sporenaggregate zu entfernen. Dieser Vorgang wurde anschließend mit jeweils weiteren 3 ml bzw. 4 ml der DO-Na-S-S-Lösung wiederholt. Die Glaswolle wurde abschließend mit 2 ml der Lösung gespült. Die so gewonnene Sporensuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die gefrorenen Sporensuspensionen wurden der Fachgruppe 4.II.2 „Bioaerosole“ der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin übergeben. In der weiteren Verarbeitung wurden die aufgetauten Sporensuspensionen bei 3438 xg für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge 5804R, Eppendorf SE) und die gewonnenen Überstände bei -20 °C gelagert. Die Sporenpellets

wurden in einem Teil des Überstandes gelöst, gepoolt und dessen Konzentration mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Zusätzlich wurden mikroskopische Bilder der Sporen aufgenommen, um diese morphologisch zu charakterisieren und deren Sporendurchmesser (DMi1, Leica Microsystems GmbH) mittels der Software LAS X (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) zu bestimmen. Die gewonnenen Sporensuspensionen wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.1.2.2 Vorbereitung der Sporensuspensionen für die Zellkulturversuche

Für die Untersuchung des zytotoxischen und immunmodulatorischen Potentials von Schimmelpilzsporen wurden verschiedene Sporenkonzentrationen der vier beschriebenen Schimmelpilzspezies hergestellt. Hierfür wurden die Stamm-Sporensuspensionen (vgl. Abschnitt 2.1.2.1) mit dem jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt, um die zu untersuchenden Sporenkonzentrationen herzustellen. Von den Schimmelpilzen *A. botrytis* und *S. chartarum* CBS wurden Sporensuspensionen mit Konzentrationen von 10 bis  $10^6$  Sporen/ml Medium hergestellt. Da im Experiment 100 µl der hergestellten Sporensuspension zu 200 µl des jeweiligen Mediums im Well gegeben wird, wurden Sporenkonzentrationen von 3,3 bis  $3,3 \times 10^5$  Sporen/ml Medium untersucht. Von den Schimmelpilzen *A. versicolor* und *P. chrysogenum* wurden Sporensuspensionen mit Konzentrationen von 10 bis  $10^8$  Sporen/ml Medium hergestellt und durch die 1:3 Verdünnung im Well Endkonzentrationen von 3,3 bis  $3,3 \times 10^7$  Sporen/ml Medium untersucht.

### 2.1.2.3 Vorbereitung der Partikelsuspensionen für die Zellkulturversuche

Um zu untersuchen, ob die Sporen einen rein physikalischen Einfluss auf die Zellviabilität besitzen könnten, wurden die Zellen mit inerten Silica-(SiO<sub>2</sub>-) Mikropartikeln (microParticles GmbH) in drei verschiedenen Größen (Ø2,96 µm, Ø7,0 µm und Ø15,03 µm) entsprechend der Sporengößen der untersuchten Schimmelpilze exponiert. Die bereitgestellten wässrigen Partikelsuspensionen wurden zunächst dreimal mit Zellkulturmedium gewaschen, indem nach der Zugabe des Mediums die Suspension zentrifugiert und der Überstand abgenommen wurde. Anschließend wurden die Partikel im Medium homogenisiert, eine Stammsuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  Partikel/ml Medium hergestellt und autoklaviert. Nach erneutem Zentrifugieren und Abnahme des Überstandes wurden die Partikel in 1 ml Medium homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Analog zu den Untersuchungen der Sporensuspensionen wurden Partikelkonzentrationen von 10 bis  $10^8$  Partikel/ml Medium aus der Stammsuspension der Mikropartikel hergestellt, so dass Endkonzentrationen von 3,3 bis  $3,3 \times 10^7$  Partikel/ml Medium untersucht wurden.

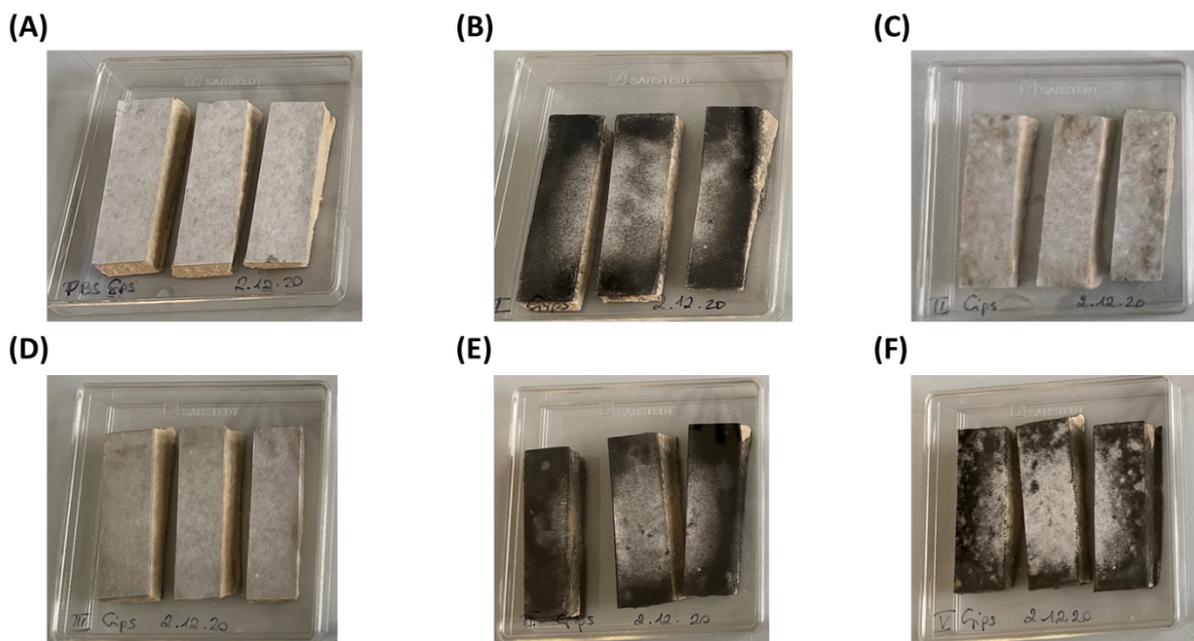
## 2.1.3 Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien

### 2.1.3.1 Herstellung Schimmelpilz-bewachsener Materialien

Für die Herstellung Schimmelpilz-bewachsener Materialien wurden Gipskartonplatten (Saint-Gobain Rigips GmbH) und Raufasertapete (Raufaser Classico, Erfurt & Sohn KG) als herkömmliche Baumaterialien sowie Malzextrakt-Agar (ME-Agar, Carl Roth GmbH) als Referenzmaterial verwendet. Die Gipskartonplatten und die Raufasertapete wurden in Stücke mit einer Größe von 2cm x 7cm (14 cm<sup>2</sup>) geschnitten und anschließend in Sterilisationsbeuteln (stericlin®, Carl Roth GmbH) autoklaviert. Der Agar wurde in quadratischen Petrischalen (Sarstedt AG & Co. KG) hergestellt, woraus 2cm x 7cm großen Stücke mit einem Skalpell herausgeschnitten und in eine neue Petrischale platziert wurden. Die Gipskarton- und Tapetenstücke wurden mit sterilem Wasser befeuchtet und ebenfalls in eine Petrischale platziert. Die Stamm-Sporensuspensionen wurden auf eine Konzentration von  $10^6$  Sporen/ml in

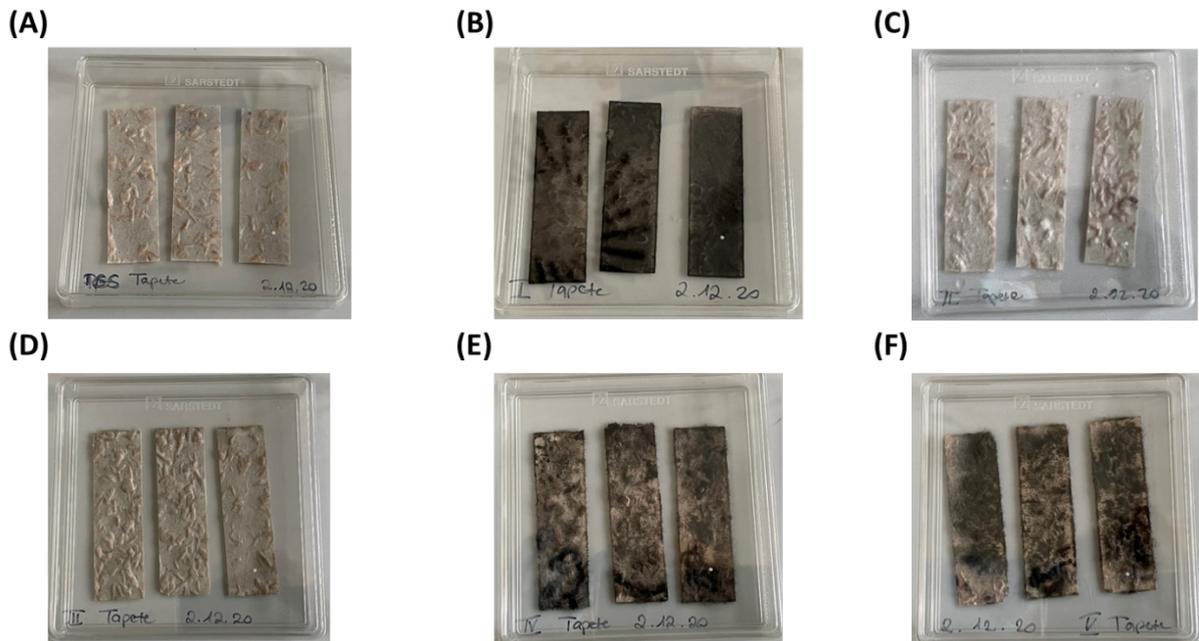
phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS; w/o: Ca and Mg, PAN-Biotech GmbH) verdünnt. Die Materialien wurden anschließend jeweils mit 100 µl der hergestellten Sporensuspension der fünf Schimmelpilzstämme gleichmäßig benetzt, so dass sich auf jedem Stück 10<sup>5</sup> Sporen befanden. Als Negativkontrolle wurden die Materialstücke in gleicher Weise mit sporenfremem PBS benetzt. In jedem Experiment wurden von jedem Material jeweils drei Stücke als Dreifachbestimmung hergestellt. Um möglichst optimale Bedingungen für das Schimmelpilzwachstum zu erreichen, wurden die beimpften Materialien anschließend für vier oder acht Wochen in einer feuchten Kammer bei 25 °C und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte für jede Schimmelpilzart ein Wachstum auf den Materialien sichergestellt werden. Repräsentative Abbildungen von bewachsenen Materialien nach acht Wochen sind in der Abbildung 3 (Gipskarton), Abbildung 4 (Raufasertapete) und Abbildung 5 (ME-Agar) dargestellt.

**Abbildung 3: Schimmelpilz-bewachsene Gipskartonstücke nach achtwöchiger Wachstumszeit**



PBS (A), *A. botrytis* (B), *A. versicolor* (C), *P. chrysogenum* (D), *S. chartarum* CBS (E), *S. chartarum* WT (F)  
 Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

**Abbildung 4: Schimmelpilz-bewachsene Raufasertapetenstücke nach achtwöchiger Wachstumszeit**



PBS (A), *A. botrytis* (B), *A. versicolor* (C), *P. chrysogenum* (D), *S. chartarum* CBS (E), *S. chartarum* WT (F)

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

**Abbildung 5: Schimmelpilz-bewachsene ME-Agarstücke nach achtwöchiger Wachstumszeit**



PBS (A), *A. botrytis* (B), *A. versicolor* (C), *P. chrysogenum* (D), *S. chartarum* CBS (E), *S. chartarum* WT (F)

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 2.1.3.2 Extraktionsmethode

Für die Herstellung von Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien wurde folgende Extraktionsmethode etabliert: Die Schimmelpilz-bewachsenen Materialstücke wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co. KG) platziert und nach Zusatz von 7 ml Methanol (ROTISOLV® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH) für 60 min bei 45 rpm mittels eines Überkopfschüttlers (Trayster digital, IKA-Werke GmbH & Co. KG) rotiert. Danach wurden die Materialien entfernt und verworfen. Das Extrakt wurde für 20 min bei 15.500 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5804R, Eppendorf SE), anschließend in ein 10 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co. KG) überführt und mittels eines Evaporators (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) bei 1500 min<sup>-1</sup> und 40 °C vollständig getrocknet. Der Probenrückstand wurde in 5 ml 10 % Methanol/AECBM Komplettmedium gelöst. Bei Anwesenheit größerer Stücke wurde erneut für 10 min bei 15.500 x g zentrifugiert, mittels Spritzenfilters (ROTILABO® Mini-Tip Polyvinylidenfluorid (PVDF), 0,2 µm, Carl Roth GmbH) steril filtriert (Injekt® Solo Luer-Lock 10ml, B. Braun SE) und bis zur weiteren Untersuchung bei 4 °C gelagert.

### 2.1.3.3 Wiederfindung der Zellviabilität vom T-2 Toxin nach Extraktion von Baumaterial

Um zu überprüfen, ob sich die etablierte Extraktionsmethode für die Extraktion von Mykotoxinen aus Baumaterialien eignet, wurde die Wiederfindung der Zellviabilität vom Mykotoxin T-2 Toxin als Beispieltoxin bestimmt. Dazu wurden sterile Materialstücke aus Gipskarton und Raufasertapete mit sterilem Wasser befeuchtet und in einer Petrischale platziert. Die Materialien wurden anschließend mit jeweils 100 µl einer Mykotoxin T-2 Toxinlösung (Romer Labs Deutschland GmbH) oder mit einer PBS-Lösung (0 nM) benetzt und über Nacht bei 25 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % in einer Feuchteammer inkubiert. Es wurden drei verschiedene Konzentrationen der T-2 Toxinlösung in PBS hergestellt, deren Einfluss auf die Zellviabilitäten zuvor anhand einer Konzentrationsreihe des T-2 Toxins ermittelt wurden. Folgende Endkonzentrationen der T-2 Toxinlösungen in 3,3 % Methanol/Medium wurden verwendet: 0,4 nM (ca. 80 % Zellviabilität), 6 nM (ca. 50 % Zellviabilität), 40 nM (ca. 20 % Zellviabilität). Das T-2 Toxin wurde aus den Materialien mit der im Abschnitt 2.1.3.2 beschriebenen Methode extrahiert und die Zellviabilität nach 24-stündiger Exposition der Proben bestimmt, die in Abschnitt 2.2.4.1 detailliert beschrieben wird. Als Kontrolle und zum Vergleich wurde die Zellviabilität von T-2 Toxinlösungen in gleichen Konzentrationen ohne vorherige Extraktion bestimmt.

### 2.1.3.4 Wiederfindung der Zellviabilität vom Satratoxin G nach Extraktion vom Filter

Um zu überprüfen, ob die Extraktionsmethode für die Extraktion von Mykotoxinen aus Filtern, die für die Bioaerosolsammlung genutzt werden, geeignet ist, wurde die Zellviabilität des Mykotoxins Satratoxin G als Beispieltoxin nach der Extraktion bestimmt. Hierfür wurde eine 2,25 µM Satratoxin G Lösung (Cayman Chemicals Company) in Methanol (ROTISOLV® HPLC Gradient Grade, Carl Roth GmbH) hergestellt, die nach der Extraktion und Zellexposition einer Endkonzentration von 15 nM in 3,3 % Methanol/Medium und einer zuvor ausgetesteten Zellviabilität von ca. 60 % entsprach. Jeweils drei Quarzfaserfilter (Ø37mm, ohne Bindemittel; Merck Millipore Ltd.) wurden in quadratischen Petrischalen platziert, anschließend wurden jeweils 100 µl der hergestellten Satratoxin G Lösung oder Methanol (0 nM) pipettiert und für 30 min trocken gelassen. Anschließend wurden die Filter in 50 ml Zentrifugenröhrchen platziert, 7 ml Methanol hinzugegeben und nach der etablierten Methode extrahiert und gelöst (vgl. Abschnitt 2.1.3.2). Als Kontrolle wurde die Zellviabilität von frisch hergestellter Satratoxin G Lösung in der entsprechenden Konzentration (0 nM; 15 nM) ohne vorherige Extraktion verwendet.

### 2.1.3.5 Mykotoxinextraktion

Nach einer Wachstumsdauer von vier oder acht Wochen wurden aus den Schimmelpilz-bewachsenen Materialstücken entsprechend der etablierten Extraktionsmethode im Abschnitt 2.1.3.2 Extrakte aus drei Probenarten hergestellt.

- a) Im ersten Ansatz wurden die bewachsenen Materialstücke genutzt. Dabei wurde das gesamte bewachsene Materialstück in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen platziert und nach Zusatz von 7 ml Methanol für 60 min bei 45 rpm mittels eines Überkopfschüttlers rotiert.
- b) Im zweiten Ansatz wurden Extrakte von den bewachsenen Oberflächen gewonnen, indem die Schimmelpilzbestandteile von der Oberfläche mittels eines sterilen befeuchteten Wattestäbchens (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH) abgestrichen wurden. Dieses wurde dann in 0,5 ml sterilem Wasser in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß ausgespült. Anschließend wurde 1 ml Methanol zu der Sporensuspension hinzugegeben und wie unter a) beschrieben für 60 min bei 45 rpm rotiert. Außerdem wurde als Bezugsgröße die Sporenkonzentration in der Suspension mittels Neubauer Zählkammer mikroskopisch bestimmt.
- c) Im dritten Ansatz wurde die Extraktionsmethode auf Aerosole angewendet, die von den bewachsenen Materialstücken mittels eines etablierten Versuchsaufbaus erzeugt (vgl. Abschnitt 2.1.3.6) und auf einem Quarzfaserfilter gesammelt wurden. Der Filter wurde anschließend in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen nach Zusatz von 7 ml Methanol für 60 min bei 45 rpm rotiert.

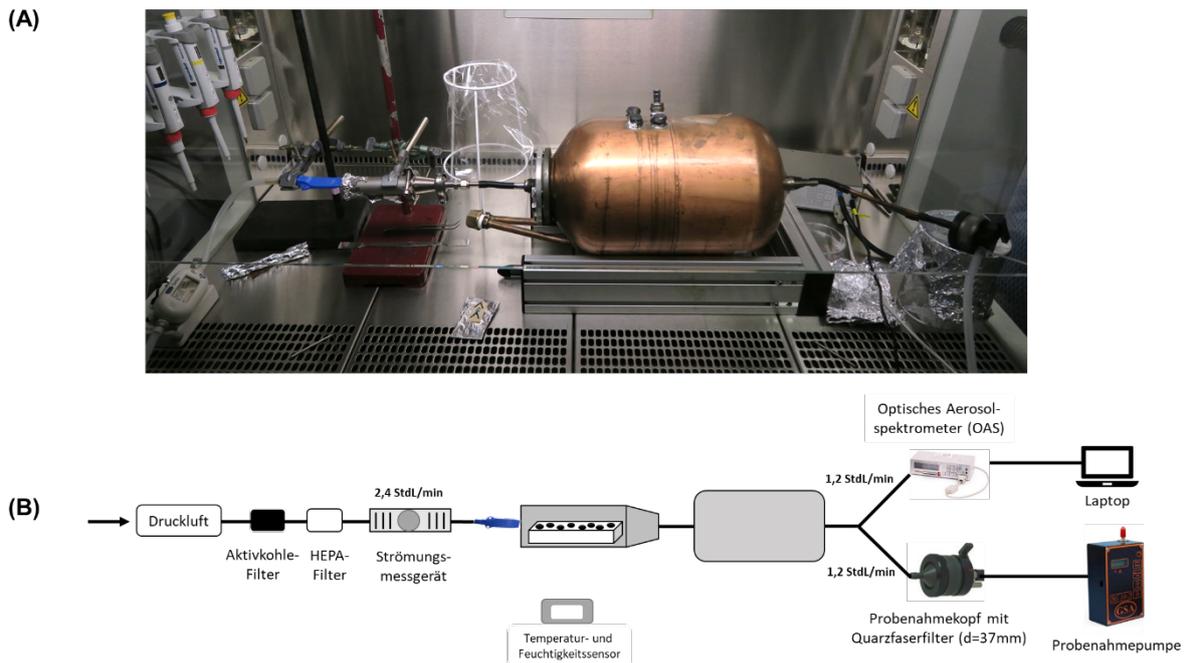
Nach der Extraktionszeit wurden die Materialien bzw. Filter entfernt und die Lösung für 10 min bei 15.000 x g für Material- und Filterextrakte bzw. 5 min bei 15.000 x g für Oberflächenextrakte zentrifugiert, um zurückgebliebene Materialstücke bzw. Sporen- und Hyphenbruchstücke zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung mittels eines Evaporators getrocknet und das erhaltene Extrakt in 10 % Methanol/AECBM Komplettmedium gelöst, mittels eines PVDF-Spritzenfilters steril filtriert und bis zur weiteren Untersuchung bei 4 °C gelagert.

### 2.1.3.6 Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen

Um eine Sammlung von luftgängigen Schimmelpilzbestandteilen von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien im Labor zu simulieren, diese auf Filtern zu sammeln und anschließend zu extrahieren, wurde ein Versuchsaufbau etabliert, der in Abbildung 6 dargestellt ist. Der Versuchsaufbau beinhaltet ein Edelstahlrohr (Ø25 mm, SC25K-304, VACOM GmbH), in dem die Schimmelpilz-bewachsenen Materialien platziert wurden. Um die gleiche Position der unterschiedlich dicken Materialien zu gewährleisten, wurde mit Edelstahltischen in der entsprechenden Höhe gearbeitet, auf denen die Materialien platziert wurden. Die Aerosolisierung der Schimmelpilzbestandteile erfolgte durch einen über die Materialien geleiteten Luftstrom. Hierfür wurde Aktivkohle- und HEPA-gefilterte Druckluft über eine Flachdüse mit acht runden Düsen à 1 mm Innendurchmesser (Flachdüse 2075, MAFA-Sebald Produktions-GmbH) verteilt auf einer Breite von 20 mm über die Materialoberfläche geleitet. Hierfür wurde ein Luftstrom mit einem konstanten Volumenstrom von 2,4 Std L/min durch eine Pumpe (Umweltanalytik Holbach GmbH) erzeugt und während der gesamten Messung mittels eines Strömungsmessers (CL-4143, TSI GmbH) kontrolliert. Der Strömungsmesser wurde dafür zwischen HEPA-Filter und Flachdüse platziert. Der eingestellte Volumenstrom entspricht einer Luftströmungsgeschwindigkeit von 2 m/s in der Materialmitte, die entsprechend an windigen Tagen mit geöffneten Fenstern bei Durchzug als auch durch die Verwendung von Ventilatoren im Innenraum erreicht werden kann. Die Luftströmungsgeschwindigkeit wurde mittels eines Anemometers (eigene Messungen mittels BAPPUevo, ELK). Die durch den Luftstrom

freigesetzten Partikel der bewachsenen Materialien wurden zur Homogenisierung in eine Kammer aus Kupfer mit einem Volumen von ungefähr 10,6 l geleitet. Zur Analyse und Sammlung wurden die Aerosolpartikel aus der Homogenisierungskammer geleitet. Im Rahmen der Etablierung wurde untersucht, ob die Partikelanzahlkonzentrationen innerhalb der Homogenisierungskammer vergleichbar sind. Hierfür wurde jeweils ein optisches Aerosolspektrometer (*optical aerosol spectrometer*, OAS; 11-D, GRIMM Aerosol Technik) in der Mitte als auch am Ende der Kammer angeschlossen, die die aerosolisierten Partikel jeweils mit einem Volumenstrom von jeweils 1,2 Std L/min aus der Kammer zogen. Es wurden jeweils zwei feuchte und zwei getrocknete mit *S. chartarum* CBS bewachsene Raufasertapetenstücke aerosolisiert. Da die Partikelanzahlkonzentration innerhalb der Kammer vergleichbar war, wurden die Partikel am Ende der Kammer gesammelt. Dabei wurde der Luftstrom geteilt und das Aerosol jeweils mit einem Volumenstrom von 1,2 Std L/min einerseits zur Partikelcharakterisierung in einem OAS und andererseits für die anschließende Herstellung von Extrakten auf einem Quarzfaserfilter gesammelt. Der Quarzfaserfilter befand sich hierbei in einem GSP Probenahmekopf mit FSP2 Saugtrichter (GSA Messgerätebau GmbH) und die aerosolisierten Schimmelpilzbestandteile wurden mittels einer Probenahmepumpe (SG10-2, GSA Messgerätebau GmbH) gesammelt (Abbildung 6). Um elektrostatische Wechselwirkungen der freigesetzten Partikel mit der Apparatur zu vermeiden, wurde die Apparatur mittels eines entsprechenden Kabels geerdet sowie leitfähige Kabel (GRIMM Aerosol Technik) verwendet. Die vorherrschende Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit wurden mit einem Sensor (VWR® Traceable®, Digitales Thermohygrometer, Typ Pen) aufgenommen. Die Messungen wurden beendet, als die Partikelanzahlkonzentration wieder konstant bei 0 Partikel/l lag. Zwischen den jeweiligen Proben wurde das Edelstahlrohr mit 70 % Ethanol (DAB, Carl Roth GmbH) gereinigt sowie für fünf Minuten mit der gefilterten Druckluft zur Trocknung durchströmt. Mittels OAS wurde sichergestellt, dass keine Partikel mehr vorhanden waren. Zur Überprüfung der Sammel- und Extraktionsmethode wurden drei angetrocknete *S. chartarum* CBS bewachsene Raufasertapetenstücke wie beschrieben aerosolisiert. Die luftgängigen Schimmelpilzbestandteile wurden mittels eines OAS aufgezeichnet als auch auf einem Quarzfaserfilter gesammelt und wie unter Abschnitt 2.1.3.5c) beschrieben extrahiert. Anschließend wurde die Zellviabilität von Lungenepithelzellen und Makrophagen nach 24-stündiger Exposition bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.4.1). PBS behandelte Raufasertapetenstücke dienten als Kontrolle.

**Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien**



Experimenteller (A) und schematischer (B) Versuchsaufbau zur Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen von den bewachsenen Materialien Gipskarton, Raufasertapete und ME-Agar

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien

Für die Untersuchungen wurden die humane bronchiale Lungenepithelzelllinie NuLi-1 und die monozytäre Zelllinie THP-1 verwendet. Bei der NuLi-1 Lungenepithelzelllinie handelt es sich um eine durch Transfektion mit hTERT und E6/E7 immortalisierte adhärenente Zelllinie. Die humane monozytäre Zelllinie THP-1 sind Suspensionszellen, die von einem Patienten mit akuter monozytischer Leukämie isoliert wurden und in adhärenente makrophagenartige Zellen differenziert werden können (Tabelle 2). Diese werden in der Regel für Studien verwendet, in denen Aspekte von Monozyten bzw. Makrophagen untersucht werden.

**Tabelle 2: Verwendete Zelllinien**

Zelllinien (Bestellnummer)	Herkunft
NuLi-1 (ATCC® CRL-4011™)	ATCC, LGC Standards GmbH
THP-1 (ACC16)	DSMZ

## **2.2.2 Kultivierung und Subkultivierung der humanen bronchialen Lungenepithelzelllinie NuLi-1**

Die NuLi-1 Zellen wurden in einem serumfreien Airway Epithelial Cell Basal Komplettmedium (AECBM, LGC Standards GmbH, PCS-300-040&PCS-300-030) in T75 Zellkulturflaschen (Corning® CellBIND® Surface, Corning) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und zweimal wöchentlich subkultiviert. Für die Zellkulturversuche wurden die Zellen zwischen den Passagen 5 bis 11 und bei einer Viabilität von ≥ 90 % verwendet.

## **2.2.3 Kultivierung und Subkultivierung der monozytären THP-1 Zelllinie**

THP-1 Zellen wurden im Komplettmedium Panserin (411S, PAN-Biotech GmbH) in T75 Zellkulturflaschen (TPP Techno Plastic Products AG) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und zweimal in der Woche subkultiviert. Für die Zellkulturversuche wurden die THP1- Zellen zwischen Passage 10 und 15 und bei einer Viabilität von ≥ 90 % verwendet.

## **2.2.4 Zellkulturversuche**

### **2.2.4.1 Durchführung des Viabilitätstest**

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der PrestoBlue™ Assay (ThermoFischer GmbH) verwendet. Die Grundlage des Assays bildet das nicht fluoreszierende membrangängige Resazurin-basierte Reagenz, welches von metabolisch aktiven Zellen zu Resofurin umgesetzt wird. Das gebildete Resofurin ist rot und stark fluoreszierend. Die Farbänderung kann durch Fluoreszenz- oder Absorptionsmessungen nachgewiesen werden. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Durchführung des Assays wurden 10.000 NuLi-1 Zellen bzw. 40.000 THP-1 Monozyten pro Well in einer schwarzen 96 well Mikrotiterplatte (Corning® CellBIND® Surface, Corning bzw. Tissue culture-treated, Corning) ausgesät. Die THP-1 Zellen wurden nach der Subkultivierung in Differenzierungsmedium (Panserin 411S mit 61,7 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Sigma-Aldrich GmbH)). Nach Aussaat wurden die Zellen für zwei Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Exposition wurde zunächst das Medium durch frisches Medium ersetzt und anschließend wurden die vorbereiteten Sporen- bzw. Partikelsuspensionen (vgl. Abschnitt 2.1.2.2 und 2.1.2.3) oder die hergestellten Extraktproben (vgl. Abschnitt 2.1.3.5) auf die Zellen appliziert, so dass sich eine Verdünnung der Proben von 1:3 im Well ergab. Jede Probe wurde in einer Dreifachbestimmung getestet. Die Expositionszeit betrug 24 bzw. 48 Stunden. Nach der Exposition wurde zur Bestimmung der Zellviabilität das Medium entfernt und durch das Zellviabilitätsreagenz, welches zuvor 1:10 mit Medium verdünnt wurde, ersetzt. Als Hintergrundkontrolle wurde die verdünnte Lösung in Dreifachbestimmung ohne Zellen gemessen. Für die Ermittlung der Zellviabilität wurde die Fluoreszenz der gemittelten Hintergrundkontrolle von allen Fluoreszenzwerten abgezogen. Die prozentuale Zellviabilität wurde berechnet, indem der gemittelte Fluoreszenzwert der Proben durch den gemittelten Fluoreszenzwert der jeweiligen Kontrolle dividiert und anschließend mit 100 multipliziert wurde (Formel 1). Als Kontrolle diente bei den Untersuchungen mit den Sporensuspensionen das AECBM Komplettmedium und bei den Extrakten die PBS Proben des jeweiligen Materials. Proben weisen eine zytotoxische Wirkung auf, wenn sich die mittlere Zellviabilität auf < 80 % reduzierte und eine statistische Signifikanz zur jeweiligen Kontrolle vorlag.

### Formel 1: Berechnung der Zellviabilität

---

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Probe}} - \text{Fluoreszenz}_{\text{Hintergrundkontrolle}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{Kontrolle}} - \text{Fluoreszenz}_{\text{Hintergrundkontrolle}}} \cdot 100$$

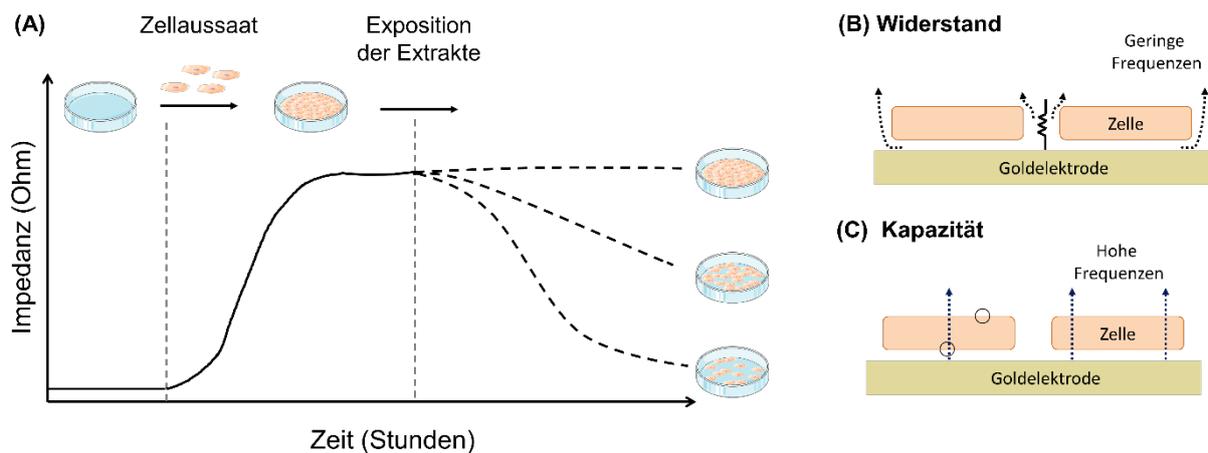
#### 2.2.4.2 Morphologische Charakterisierung der Zellen nach Exposition

Die Zellen wurden 24 h nach der Exposition mit den Proben morphologisch charakterisiert, da hierdurch schon erkennbar war, ob die Proben einen Einfluss auf die Zellen haben. Hierbei wurde auf Veränderungen der Zellschicht und -form, Bildung von granulären Einschlüssen, Vakuolen-Bildung und Zelllyse geachtet. Dafür wurden aus den Ansätzen stets 200 µl Medium entnommen, um die Zellen besser im Mikroskop betrachten zu können. Für den Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle wurden die Zellen stets an der gleichen Stelle im Well (Mitte) betrachtet und zur Dokumentation mikroskopische Bilder aufgenommen (10- und 20-fache Vergrößerung).

#### 2.2.4.3 Impedimetrische Analyse

Die impedimetrische Analyse ist ein physikalisches Analyseverfahren, welches die Reaktion einer Zellpopulation auf einen gegebenen Stimulus zeitaufgelöst und ohne Einfluss einer Reportersubstanz erlaubt. Für die Untersuchungen in diesem Projekt wurde das *Electric cell-substrate impedance sensing* (ECIS®) verwendet. Das ECIS® Verfahren misst die Änderung des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) von zellbedeckten Goldelektroden (Durchmesser: 250 µm) in einer Mikrotiterplatte bei mehreren Frequenzen als Funktion der Zeit. In Abbildung 7 ist das Prinzip des ECIS® Systems und eine repräsentative Messkurve dargestellt. Durch das Anheften und der Vermehrung der Zellen nach der Aussaat nimmt die Impedanz anfänglich zu bis eine durchgängige Zellschicht erreicht ist und die Impedanz stagniert. Durch Zugabe von Substanzen/Noxen zu den Zellen können sich die Kurvenverläufe während der Impedanzmessung verändern. Bei unbehandelten Zellen stagniert die Impedanzkurve, da die Zellen weiterhin die Goldelektroden bedecken, den Stromfluss blockieren und sich nur minimal bewegen. Bei behandelten Zellen z.B. mit toxischen Substanzen verändert sich der Kurvenverlauf, da sich beispielsweise durch das Ablösen bzw. Bewegungen der Zellen der Widerstand an den Goldelektroden verringert bzw. verändert. Mit Hilfe eines mathematischen Modells können aus den Impedanzänderungen der Widerstand und die Zellmembrankapazität berechnet werden. Bei relativ niedrigen Wechselstromraten ( $\leq 4$  kHz) fließt der größte Teil des Stroms unter und zwischen benachbarten Zellen, womit Veränderungen in den Räumen unter oder zwischen den Zellen detektiert werden und somit zur Beurteilung der Barrierefunktion verwendet werden können. Bei relativ hohen Wechselstromraten ( $>32$  kHz) fließt mehr Strom durch die Zellmembranen, wodurch dieser stärker von der Zelladhärenz beeinflusst wird und somit für die Messung von Zellwachstumsraten und Zytotoxizität verwendet wird.

**Abbildung 7: Prinzip der impedimetrischen Analyse mit ECIS® System**



Quelle: modifiziert nach ibidi GmbH; Abbildung nutzt Grafiken von Servier Medical Art von Servier, lizenziert unter einer Creative Common Attribution 3.0 Unported Lizenz

Für die Versuchsreihen in diesem Projekt wurde das ECIS® Gerät Modell Z-Theta mit einer 96 well Array Station (Applied Biophysics) verwendet. Vor der Zellaussaat wurden die 96-Mikrotiterplatten (Applied Biophysics, Troy) mit humanen Kollagen IV (Sigma-Aldrich GmbH) zur Sicherstellung der Zelladhärenz beschichtet, anschließend abgesaugt, durch frisches Medium ersetzt und die Elektroden der Platte im Gerät stabilisiert. Anschließend wurden 10.000 NuLi-1 Zellen pro Well ausgesät und in die ECIS® Station im Inkubator (Binder GmbH) platziert und die Messung gestartet. Die Impedanz wurde bei drei verschiedenen Frequenzen gemessen (4 kHz, 16 kHz, 64 kHz), um daraus den Widerstand bei 4 kHz, die Impedanz bei 16 kHz und die Kapazität bei 64 kHz zu berechnen. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Konfluenz (48 h) inkubiert. Es erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe der Extraktproben (200 µl Medium + 100 µl Probe). Als Kontrolle dienten unbehandelte NuLi-1 Zellen, hier wurde nur Medium hinzugegeben und NuLi-1 Zellen, die mit den jeweiligen Negativkontrollen der Extraktproben exponiert wurden. Die Impedanzmessung erfolgte für 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen morphologisch mittels Hellfeldmikroskopie charakterisiert (vgl. 2.2.4.2) und die Zellviabilität (vgl. 2.2.4.1) bestimmt. Für die Datenauswertung der Impedanzmessung wurde zunächst bei allen Messwerten das Hintergrundsignal subtrahiert. Anschließend wurden alle Datenpunkte normalisiert, indem die Werte des Widerstandes, der Impedanz bzw. der Kapazität von jedem Zeitpunkt durch den Wert des ersten Zeitpunktes der Extraktexposition ( $t = 0$ ) dividiert wurde. Die normalisierten Werte wurden gegen die Zeit in einem Liniendiagramm dargestellt. Außerdem wurde die Fläche unter den Kurven (AUC) zur Quantifizierung und statistischen Auswertung bestimmt.

### 2.2.5 Bestimmung der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im Rahmen der Immunantwort werden zur Beeinflussung anderer Zellen von Zellen Zytokine sezerniert, die abhängig von ihrer Wirkung entweder entzündungsfördernde oder -hemmende Wirkungen haben können. So können Entzündungsreaktionen auch durch Bioaerosolbestandteile und somit auch durch Schimmelpilzbestandteile hervorgerufen werden. Um diesen Einfluss von Schimmelpilzbestandteilen auf die Lungenepithelzellen zu untersuchen, wurden in diesem Projekt die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) im Zellkulturüberstand der NuLi-1 bzw. THP-1 Zellen nach Extraktexposition mittels

enzymgekoppeltem Immunoassay (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) nach dem „Sandwich“-Prinzip bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration von GM-CSF wurde unter Verwendung des Kits „ELISA MAX™ Standard Set Human GM-CSF“ (BioLegend) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration von IL-1 $\beta$  wurde nach einem in der BAuA etabliertem Protokoll bestimmt. Dafür wurden zunächst Mikrotiterplatten mit einem humanen Erstantikörper IL-1 beta antibody (MAB601, R&D Systems) immobilisiert und die Wells anschließend blockiert (2 % Rinderserumalbumin), um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nachfolgend wurden die Standardkonzentrationsreihe (0 bis 500 pg/ml IL-1 $\beta$ ) in Doppelbestimmung und die Extraktproben in einer Dreifachbestimmung in die Wells gegeben und inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem sekundären Biotin-markierten humanen IL-1 $\beta$  Antikörpers (BAF201, R&D Systems), der an eine Stelle des Zielproteins bindet. Für die Detektion des Enzymkomplexes wurde nachfolgend mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper (Streptavidin-HRP; Jackson ImmunoResearch Laboratories), welcher am Biotin des zweiten Antikörpers bindet, inkubiert. Zum Nachweis des Enzymkomplexes erfolgte die Zugabe des farblosen Substrates Tetramethylbenzidin (TMB, SeramunBlau® fast2, Seramun Diagnostica GmbH), welches in Anwesenheit der Peroxidase das Substrat zu einer blau gefärbten Lösung umgesetzt. Der Farbumschlag wurde durch Zugabe von Schwefelsäure (2 N, Carl Roth GmbH) beendet und die Absorption bei 450 nm und 570 nm gemessen. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Mikrotiterplatten mit einer Waschlösung (0,1 % Tween20 (Carl Roth GmbH) /PBS) mehrfach gewaschen. Als Positivkontrollen wurden zum einen für die Konzentrationsbestimmung des Zytokins GM-CSF eine 3,33 ng/ml (2,6 nM) Pam2CSK4-Lösung (InvivoGen) verwendet. Zum anderen wurde für die Konzentrationsbestimmung des Zytokins IL-1 $\beta$  eine 1,67  $\mu$ g/ml (2,2  $\mu$ M) Nigericin-Lösung (InvivoGen) und eine 3,33  $\mu$ g/ml Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH) verwendet. Zur Auswertung wurden die Standardkurven von GM-CSF und IL-1 $\beta$  mittels einer 4-Parameter-Logistik-Regression angepasst, wodurch die Konzentrationen der Zytokine in den Extraktproben berechnet werden konnten.

### 2.3 Statistische Auswertung

Alle Untersuchungen wurden in zwei bzw. drei unabhängigen Versuchen mit jeweiliger Dreifachbestimmung (Sechsfachbestimmung bzw. Neunfachbestimmung) durchgeführt. Ausnahmen bildeten die Untersuchungen der Sporensuspensionen und Wiederfindungsexperimente (Filter), die lediglich als Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc.) bei allen Daten mit einer mindestens Dreifachbestimmung. Die Testung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. Statistische Signifikanzen wurden zwischen den Proben (Sporen- bzw. Partikelsuspensionen, Extraktproben) und der jeweiligen Kontrolle untersucht. Der ungepaarte t-Test wurde bei normalverteilten Daten und der Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Daten angewandt. Die statistische Datenauswertung von mehreren Gruppen erfolgte bei normalverteilten Daten mittels Varianzanalyse (ANOVA) und bei nicht normalverteilten Daten mittels Kruskal-Wallis Test. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen und entsprechend gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

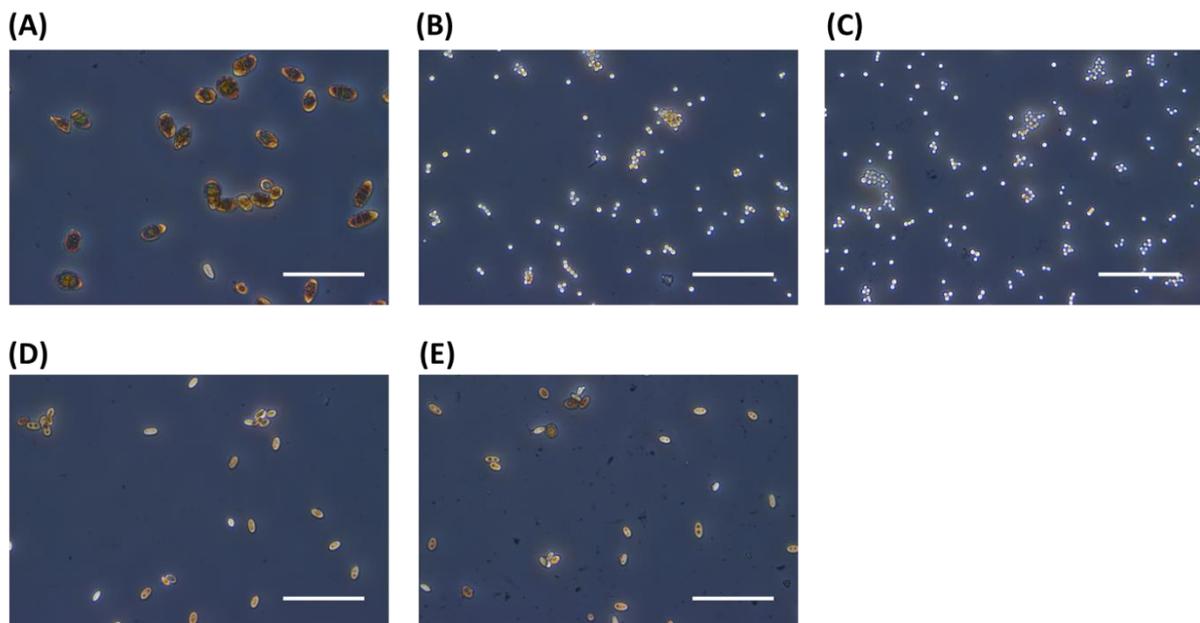
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung der Schimmelpilz-Sporen

#### 3.1.1 Morphologische Charakterisierung

Zur Erfassung der gesundheitlichen Wirkungen bei Schimmelbefall wurden Sporen fünf verschiedener Schimmelpilze verwendet, die Auslöser für feuchtebedingten Innenraumschimmel sein können. Um die Sporen morphologisch zu charakterisieren, wurden mikroskopische Bilder aufgenommen (Abbildung 8) und deren Größen bestimmt (Tabelle 3). Die Sporen von *A. botrytis* (Abbildung 8A) sind ellipsenförmig und mit 12 µm bis 18 µm die größten von den untersuchten Schimmelpilzen. *A. versicolor* und *P. chrysogenum* sind mit 2 µm bis 3 µm die kleinsten Sporen (Abbildung 8B und 8C). Sie sind kugelförmig und bilden teilweise Aggregate. Die beiden *S. chartarum* Stämme bilden Sporen mit einer Größe von 6 µm bis 8 µm. Sie sind ellipsenförmig (Abbildung 8D, Abbildung 8E) und mehrere Sporen sind hierbei in einer Schleimkapsel eingebettet.

**Abbildung 8: Morphologie der Schimmelpilz-Sporen**



*A. botrytis* (A), *A. versicolor* (B), *P. chrysogenum* (C), *S. chartarum* CBS (D), *S. chartarum* WT (E); Maßstabsbalken entspricht 50 µm

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

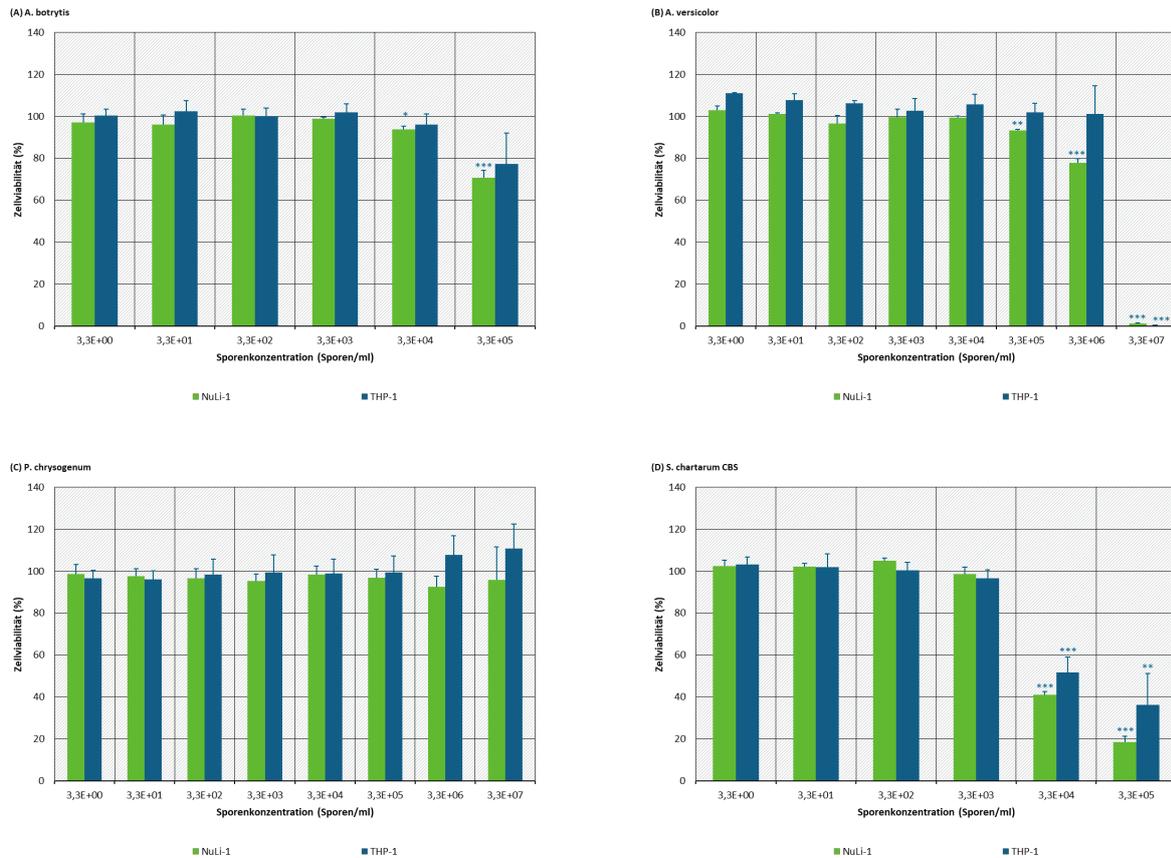
**Tabelle 3: Sporengrößen**

Schimmelpilze	Sporengrößen in µm
<i>A. botrytis</i>	12-18
<i>A. versicolor</i>	2-3
<i>P. chryogenum</i>	2-3
<i>S. chartarum</i> CBS	6-8
<i>S. chartarum</i> WT	6-8

### 3.1.2 Bestimmung des zytotoxischen Potentials

Um das zytotoxische und immunmodulatorische Potential der Schimmelpilzsporen der vier Spezies zu untersuchen, wurden NuLi-1 und THP-1 Zellen mit jeweils verschiedenen Sporenkonzentrationen im Zellkulturmedium für 24 h exponiert. Die Viabilitätsuntersuchungen zeigten, dass diese im Vergleich zwischen NuLi-1 und THP-1 Zellen sehr ähnlich ausfallen und die zytotoxischen Wirkungen der Sporen konzentrationsabhängig sind (Abbildung 9). Beide Zelllinien zeigten in Anwesenheit der Sporen von *A. botrytis* in einer Konzentration von  $3,3$  bis  $3,3 \times 10^4$  Sporen/ml Medium keinen Viabilitätsverlust, während eine Konzentration von  $3,3 \times 10^5$  Sporen/ml Medium einen geringen Viabilitätsverlust an den NuLi-1 Zellen auslösten (Zellviabilität  $70,8 \pm 3,5$  %). In Anwesenheit der Sporen von *A. versicolor* war ab einer Sporenkonzentration von  $3,3 \times 10^6$  Sporen/ml Medium ein geringer Viabilitätsverlust an NuLi-1 Zellen erkennbar. Bei einer Konzentration von  $3,3 \times 10^7$  Sporen/ml Medium wurde ein deutlicher Viabilitätsverlust und somit zytotoxischer Effekt von 100 % erreicht, da keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden konnten. In Anwesenheit der Sporen von *P. chrysogenum* konnte hingegen bei keiner der untersuchten Sporenkonzentrationen eine Reduktion in der Zellviabilität bestimmt werden. Die Anwesenheit von Sporen von *S. chartarum* CBS führte bei Sporenkonzentrationen von  $3,3 \times 10^4$  bzw.  $3,3 \times 10^5$  Sporen/ml Medium bei beiden Zelllinien zu zytotoxischen Effekten mit einer Zellviabilität zwischen 15 % und 60 %. Eine morphologische Bewertung der Zellen, welche ebenfalls auf die Zellvitalität rückschließen lässt, war nur bei geringen Sporenkonzentrationen möglich. Hohe Sporenkonzentrationen, bei denen auch die zytotoxischen Wirkungen auftraten, konnten für die Spezies *A. botrytis*, *A. versicolor* und *P. chrysogenum* nicht beurteilt werden, da die Zellen unter den Sporen nicht mehr sichtbar waren. Bei den Sporen von *S. chartarum* CBS konnte jedoch im Gegensatz zu den anderen Schimmelpilzspezies nach 24 h Exposition eine teilweise Auskeimung der Sporen sowie eine vermehrte Hyphenbildung beobachtet werden (nicht dargestellt).

**Abbildung 9: Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Sporensuspensionen der Schimmelpilze**



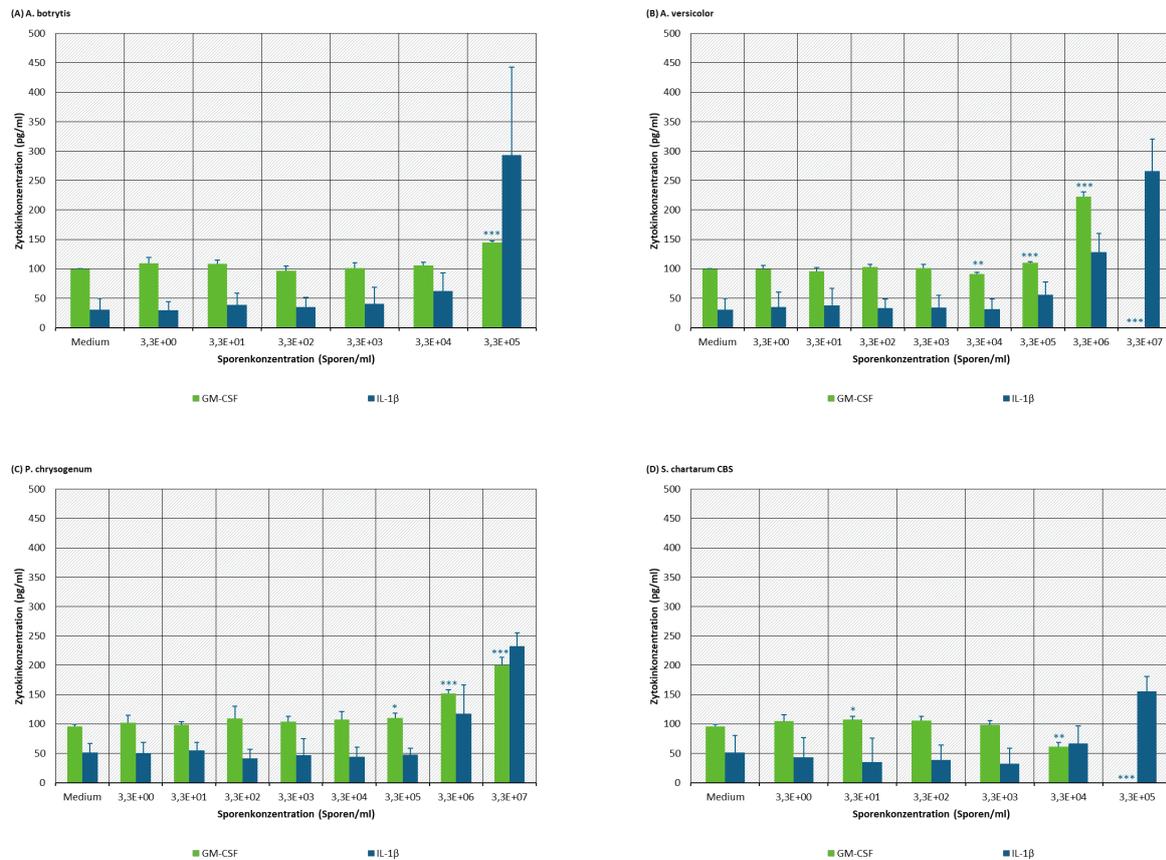
A. botrytis (A), A. versicolor (B), P. chrysogenum (C), S. chartarum CBS (D), Als Kontrolle wurde die Zellviabilität des AECBM Kompletmediums verwendet; n=2-3; Mittelwert ± Standardabweichung; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.1.3 Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials

Zusätzlich zur Zellviabilität wurde die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine GM-CSF und IL-1 $\beta$  der Zellen nach der Exposition mit den Sporensuspensionen untersucht. Im Allgemeinen zeigen die Ergebnisse (Abbildung 10), dass eine Reduzierung der Zellviabilität mit einer veränderten Freisetzung der untersuchten Zytokine einhergeht. Im Falle der Anwesenheit der Sporen von A. botrytis und P. chrysogenum nahm die Freisetzung der beiden Zytokine mit steigender Sporenkonzentration zu. Das gleiche Bild zeichnete sich mit einer steigenden Sporenkonzentration von A. versicolor ab, mit einer Ausnahme. Unter der höchsten Sporenkonzentration konnte keine Freisetzung des Zytokins GM-CSF mehr nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der Sporen von S. chartarum CBS führte mit steigender Sporenkonzentration zu einem Anstieg von IL-1 $\beta$ , während die freigesetzte GM-CSF sank. Anhand der Ergebnisse ist erkennbar, dass die steigende Sporenkonzentration oft mit einem Auftreten von zytotoxischen Effekten und einer Erhöhung der IL-1 $\beta$  Konzentration einhergeht, wobei bei der GM-CSF Freisetzung kein einheitliches Muster erkennbar ist.

**Abbildung 10: Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) im Zellkulturmedium nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Sporensuspensionen der Schimmelpilze**



A. botrytis (A), A. versicolor (B), P. chrysogenum (C), S. chartarum CBS (D); n=3 (GM-CSF), n=2 (IL-1 $\beta$ ); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001

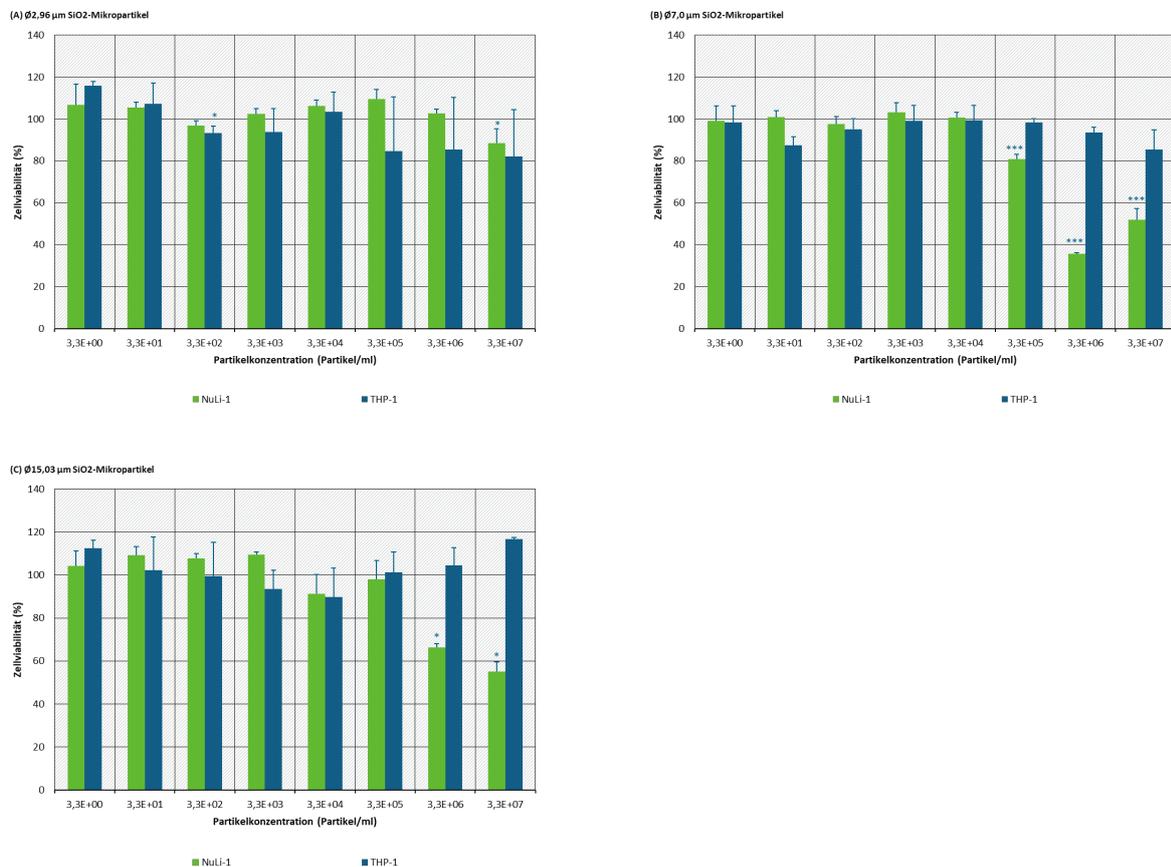
Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.1.4 Bestimmung des zytotoxischen Potentials von inerten SiO<sub>2</sub>-Mikropartikeln

Um einen möglichen rein physikalischen Einfluss auf die Zellviabilität aufgrund der Sporen auszuschließen, wurden beide Zelllinien mit inerten SiO<sub>2</sub>-Mikropartikeln in drei verschiedenen Größen ( $\varnothing$ 2,96  $\mu$ m,  $\varnothing$ 7,0  $\mu$ m und  $\varnothing$ 15,03  $\mu$ m) entsprechend der Sporengößen der untersuchten Schimmelpilze exponiert. Hierbei zeigte sich, dass die SiO<sub>2</sub>-Mikropartikel mit einem Durchmesser von 2,96  $\mu$ m keinen Viabilitätsverlust bei beiden Zelllinien aufwiesen (Abbildung 11), weshalb der zytotoxische Effekt der Sporen von A. versicolor wahrscheinlich nicht auf einen möglichen Partikeleffekt zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 9). Die Anwesenheit der SiO<sub>2</sub>-Mikropartikel mit dem Durchmesser von 7  $\mu$ m und einer Konzentration von 3,3x10<sup>5</sup> Partikel/ml Medium führte zu einem geringen Viabilitätsverlust (19,1 $\pm$ 2,1 %) an den NuLi-1 Zellen. Dieser Effekt erklärt jedoch nicht die geringere Zellviabilität von 15 % bis 60 % bei gleichen Sporenkonzentrationen von S. chartarum CBS. Erst bei noch höheren Partikelkonzentrationen von 3,3x10<sup>6</sup> bzw. 3,3x10<sup>7</sup> Partikel/ml Medium ( $\varnothing$ 7  $\mu$ m und  $\varnothing$ 15,03  $\mu$ m) konnten bei den NuLi-1 Zellen ein zytotoxischer Effekt mit einer Zellviabilität zwischen 40 % und 65 % detektiert werden. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine verminderte Zellviabilität in Anwesenheit der Sporensuspensionen nicht ausschließlich auf die Partikeleigenschaften der Sporen zurückzuführen ist. Auch wenn der Einfluss von Partikeleffekten auf die Zellviabilität nur gering scheint, kann dieser jedoch nicht ganz

ausgeschlossen werden. Um in allen weiteren Experimenten mögliche Partikeleffekte zu vermeiden, wurden aus diesem Grund die zytotoxischen und immunmodulatorischen Untersuchungen mit Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien durchgeführt.

**Abbildung 11: Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von inerten SiO<sub>2</sub>-Mikropartikeln**



SiO<sub>2</sub>-Mikropartikel mit Ø2,96 µm (A), Ø7,0 µm (B), Ø15,03 µm (C); Als Kontrolle wurde die Zellviabilität des AECBM Komplettmediums verwendet; n=3; Mittelwert ± Standardabweichung; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001  
Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

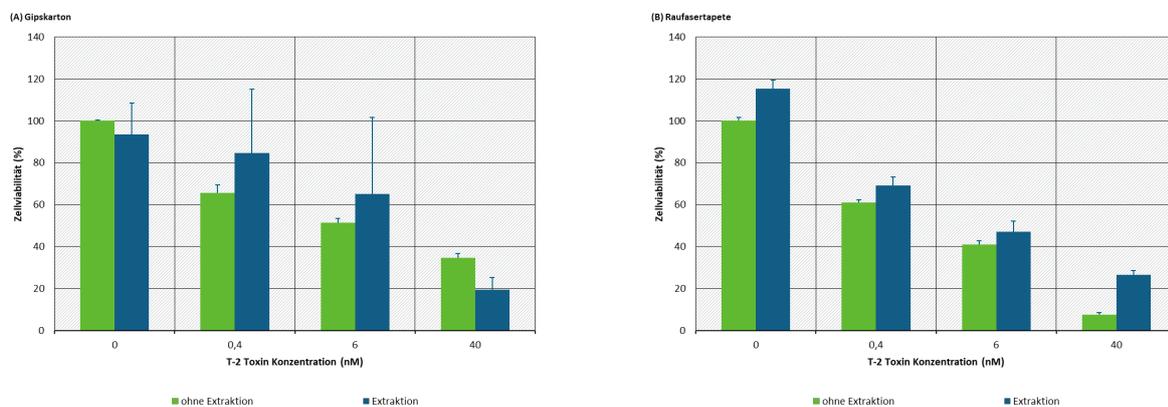
## 3.2 Untersuchung der Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien

### 3.2.1 Mykotoxinextraktion aus Baumaterialien

Schimmelpilze können Mykotoxine in ihre Umgebung absondern. Bei Wachstum von Schimmelpilzen auf Baumaterialien wie Gipskarton und Tapete ist davon auszugehen, dass somit auch Mykotoxine in das Material abgegeben werden. Um dies zu überprüfen, sollten Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Baumaterialien hergestellt werden. Hierfür wurde eine Methode etabliert, die einerseits ein gutes Extraktionsergebnis aus den Materialien zeigen und andererseits keinen Effekt auf die Zellviabilität haben sollte. Zur Überprüfung der etablierten Extraktionsmethode wurden Untersuchungen mit dem T-2 Toxin durchgeführt. Dazu wurde die T-2 Toxinlösung in drei verschiedenen Konzentrationen (0,4 nM; 6 nM; 40 nM) als auch PBS als Kontrolle (0 nM) auf Gipskarton- und Raufasertapetenstücke gegeben, entsprechend der beschriebenen Methode extrahiert (vgl. Abschnitt 2.1.3.2). Der Einfluss des T-2 Toxins auf die Zellviabilität wurde anhand der Extrakte im Vergleich zu T-2 Toxinlösungen in gleichen

Konzentrationen ohne vorherige Extraktion untersucht. Die hergestellten Extrakte aus Gipskarton und Raufasertapete mit einer Toxinkonzentration von 0 nM, 0,4 nM und 6 nM zeigten im Vergleich ähnliche Zellviabilitäten wie die Toxinlösungen ohne Extraktion. Die Extrakte mit der höchsten Toxinkonzentration (40 nM) wiesen hingegen große Unterschiede in der Zellviabilität auf. Die Extrakte aus den mit T2-Toxin behandelten Gipskarton zeigten nur die Hälfte der Zellviabilität im Vergleich zur T-2 Toxinlösung ohne vorherige Extraktion, wohingegen die Extrakte aus der mit dem T2-Toxin behandelten Raufasertapete eine dreifach höhere Zellviabilität im Vergleich zur T-2 Toxinlösung ohne vorherige Extraktion aufwiesen (Abbildung 12). Da die hergestellten Extrakte aus den behandelten Baumaterialien nur im Bereich der höchsten Konzentration von 40 nM T-2 Toxin große Unterschiede in der Zellviabilität zeigten, wurde die Extraktionsmethode in weiterführenden Untersuchungen verwendet, um Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien herzustellen und somit Mykotoxine zu extrahieren.

**Abbildung 12: Zellviabilitäten von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von T-2 Toxinlösungen nach Aufbringung auf Baumaterialien Gipskarton und Raufasertapete**



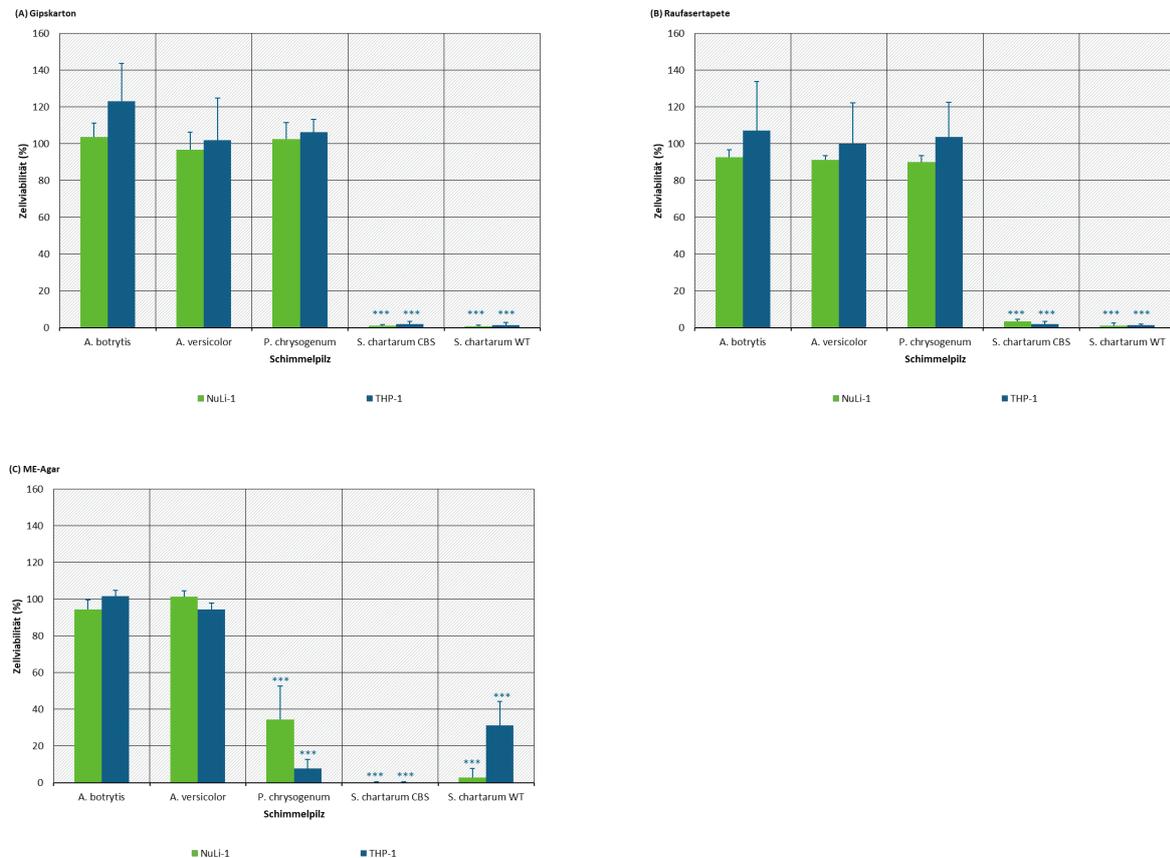
Gipskarton (A), Raufasertapete (B); Als Kontrolle wurde die Zellviabilität von T-2 Toxinlösungen ohne Extraktion in der jeweiligen Konzentration verwendet; n=3; Mittelwert ± Standardabweichung

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.2.2 Bestimmung des zytotoxischen Potentials nach achtwöchiger Wachstumszeit

Zur Untersuchung des zytotoxischen Potentials Schimmelpilz-bewachsener Baumaterialien wurden NuLi-1 und THP-1 Zellen mit Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Gipskarton, Raufasertapete und ME-Agar nach einem achtwöchigem Schimmelpilzwachstum für 24 h exponiert (Abbildung 13). Sämtliche Extrakte aus den mit *A. botrytis* und *A. versicolor* bewachsenen Materialien zeigten keinen signifikanten Viabilitätsverlust an den beiden Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen (Extrakten aus den mit PBS behandelten Materialien). Die Extrakte aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenen Gipskarton und Raufasertapete zeigten ebenfalls keinen Viabilitätsverlust auf die Zellen. Extrakte, die aus bewachsenen ME-Agar hergestellt wurden, führten jedoch zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellviabilität auf  $34,3 \pm 18,3$  % bei NuLi-1 Zellen und auf  $7,7 \pm 5,0$  % bei THP-1 Zellen. Alle Extrakte aus den mit den beiden *S. chartarum* Stämmen bewachsenen Materialien führten zu einer Reduktion der Zellviabilität auf bis zu 0 % bei beiden Zelllinien. Eine Ausnahme bildeten jedoch die Extrakte aus den mit *S. chartarum* WT bewachsenen ME-Agar. Hier reagierten die THP-1 Makrophagen nur mit einer Reduktion der Zellviabilität auf  $31,1 \pm 13,1$  %.

**Abbildung 13: Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach achtwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**

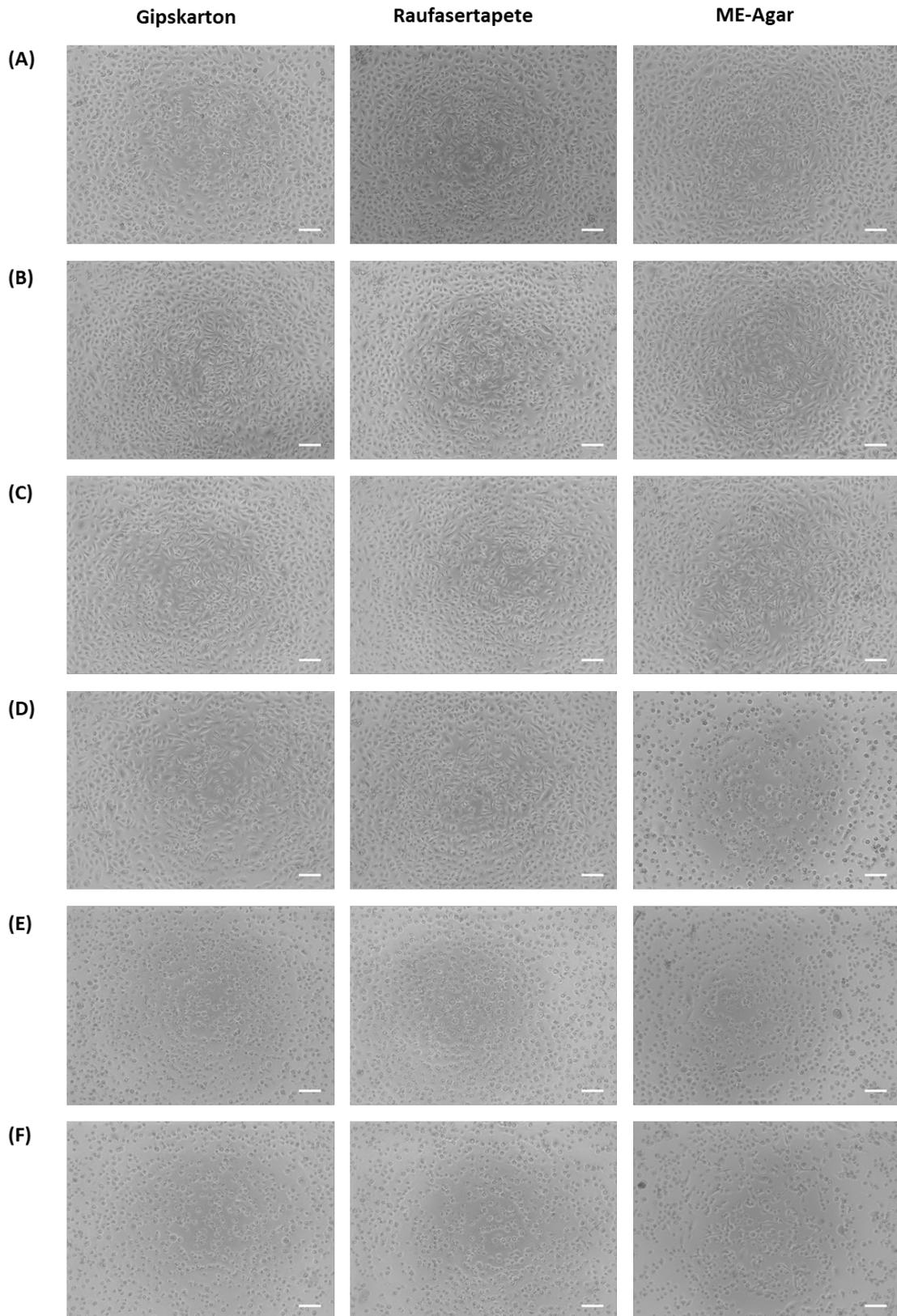


Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); Als Kontrolle wurde die Zellviabilität der Extrakte aus den jeweiligen PBS behandelten Materialien verwendet; n=7-9; Mittelwert ± Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Des Weiteren wurde die Zellmorphologie nach der Exposition mit den Extrakten mikroskopisch untersucht. Bei den NuLi-1 Zellen waren eindeutige morphologische Änderungen zwischen den Extrakten erkennbar. Unbehandelte NuLi-1 Zellen sind erhaben, zeigen einen hellen Rand und bilden eine konfluente zusammenhängende Zellschicht aus. Diese Zellmorphologie war ebenfalls nach der Exposition der Extrakte aus den mit *A. botrytis* und *A. versicolor* bewachsenen Materialien sowie der Extrakte aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenen Gipskarton und Raufasertapete erkennbar (Abbildung 14). Dies verdeutlicht, dass keine Zytotoxizität von den Extrakten ausgeht und spiegelt demnach die Ergebnisse der Zellviabilität wider. Nach der Exposition des Extraktes aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar haben sich die meisten NuLi-1 Zellen abgelöst, so dass die Zellschicht viele leere Bereiche aufwies. Dies verdeutlicht die Zytotoxizität des Extraktes. Nach der Exposition aller Extrakte aus *S. chartarum* bewachsenen Materialien wiesen nahezu alle NuLi-1 Zellen einen runden Habitus auf und zeigten eine geringe bis keine Adhärenz, erkennbar an einer sehr lückenhaften Zellschicht. Nach Exposition der Extrakte aus *S. chartarum* bewachsenen ME-Agar zeigten die Zellen eine runde und aufgeblähte bis hin zur spindelförmigen Morphologie (ME-Agar von *S. chartarum* WT). Diese Zellveränderungen deuten auf eine hohe Zytotoxizität hin und stimmen ebenfalls mit den Daten zur Zellviabilität überein.

**Abbildung 14: Zellmorphologie der NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien nach achtwöchiger Wachstumszeit**



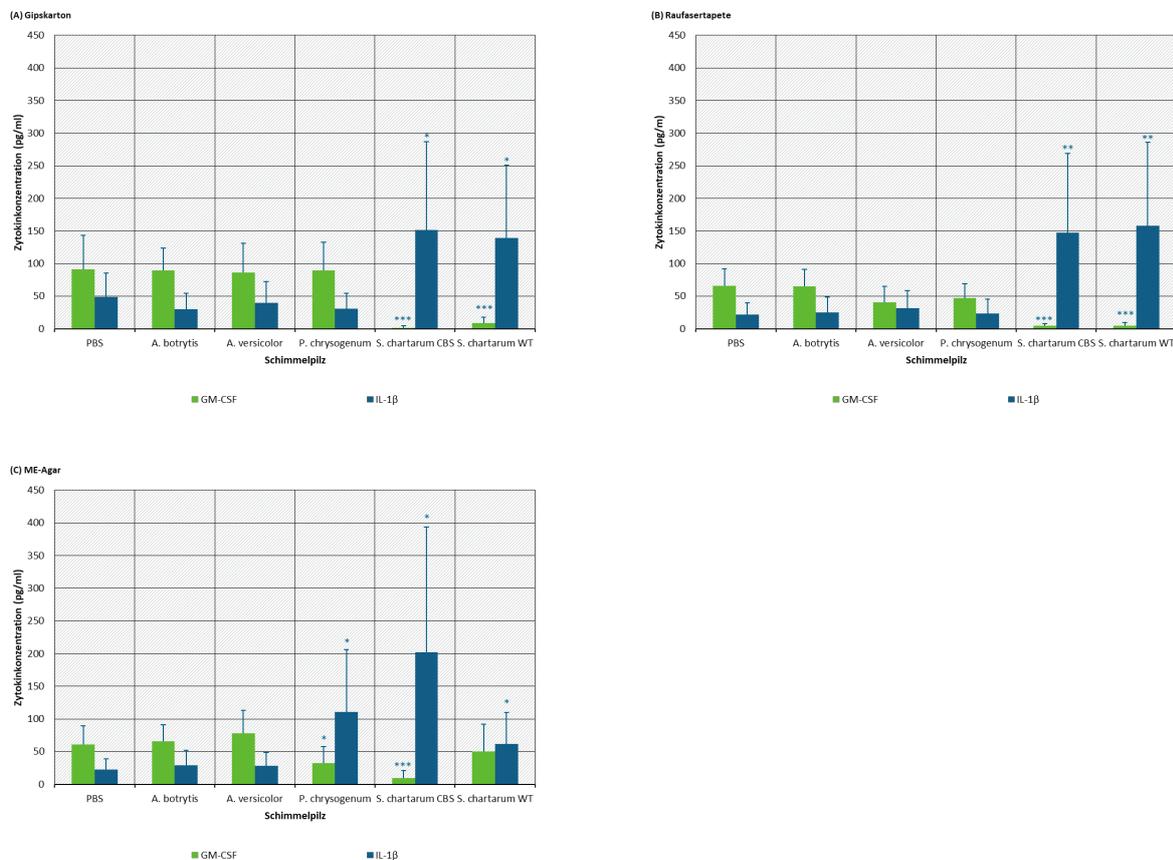
PBS (A), *A. botrytis* (B), *A. versicolor* (C), *P. chrysogenum* (D), *S. chartarum* CBS (E), *S. chartarum* WT (F); Maßstabsbalken entspricht 100 µm

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.2.3 Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials nach achtwöchiger Wachstumszeit

Zur Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials der Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien wurde die Freisetzung der Zytokine GM-CSF aus NuLi-1 und IL-1 $\beta$  aus THP-1 Makrophagen untersucht (Abbildung 15). Extrakte aus den mit *A. botrytis* und *A. versicolor* bewachsenen Materialien zeigten keine Änderung der Zytokinkonzentration beider Zytokine im Vergleich zur Kontrolle (Extrakten aus den mit PBS behandelten Materialien). Gleiches gilt für die Extrakte aus dem mit *P. chrysogenum* bewachsenen Gipskarton und der Raufasertapete. Die Exposition mit Extrakten aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar führte jedoch zu einer statistisch signifikanten Hemmung der GM-CSF Freisetzung aus den NuLi-1 Zellen und zu einer statistisch signifikant höheren IL-1 $\beta$  Freisetzung aus den THP-1 Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle. Die Exposition mit den Extrakten aus mit beiden *S. chartarum* Stämmen bewachsenen Materialien führte mit einer Ausnahme zu einer statistisch signifikanten Hemmung der GM-CSF Freisetzung und einer statistisch signifikant höheren IL-1 $\beta$  Freisetzung, wobei die Standardabweichungen zum Teil sehr hoch waren. Analog zur geringeren Viabilitätsreduktion zeigten die Extrakte aus mit *S. chartarum* WT bewachsenen ME-Agar eine geringere IL-1 $\beta$  Freisetzung als die Extrakte aus mit *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agar. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass eine Reduktion der Zellviabilität bei den NuLi-1 Zellen mit einer verringerten GM-CSF Freisetzung und bei den THP-1 Makrophagen mit einer erhöhten IL-1 $\beta$  Freisetzung assoziiert ist.

**Abbildung 15: Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) im Zellkulturmedium nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach achtwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



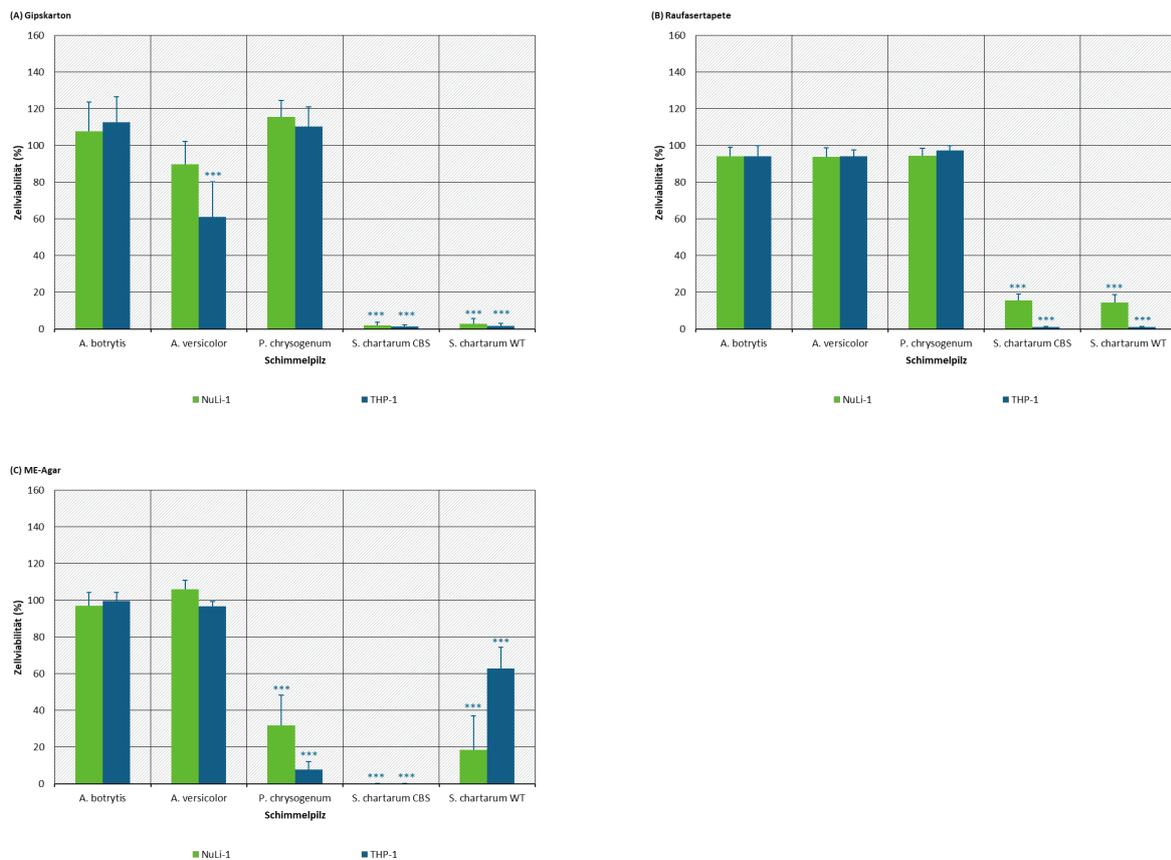
Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); n=9; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.2.4 Bestimmung des zytotoxischen Potentials nach vierwöchiger Wachstumszeit

Um den Zeitaufwand bis zur Verwendung der Schimmelpilz-bewachsenen Materialien zu verringern, wurden Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien bereits nach einer Wachstumszeit von vier Wochen hergestellt und dessen zytotoxisches und immunmodulatorisches Potential untersucht. Die Ergebnisse der Extrakte aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit zeigten nur geringe Unterschiede in der Zellviabilität im Vergleich zu den Ergebnissen nach achtwöchiger Wachstumszeit (vgl. Abbildung 13 und Abbildung 16). Ein Unterschied bestand darin, dass ein statistisch signifikanter Viabilitätsverlust an den THP-1 Makrophagen nach der Exposition der Extrakte aus dem mit *A. versicolor* bewachsenen Gipskarton detektiert wurden. Weiterhin reduzierte sich die Zellviabilität nach der Exposition der Extrakte aus den mit *S. chartarum* WT bewachsenen ME-Agar auf  $18,6 \pm 18,4$  % (NuLi-1) und  $62,8 \pm 11,6$  % (THP-1) nach vierwöchiger Wachstumszeit und somit war der Viabilitätsverlust geringer als nach achtwöchiger Wachstumszeit. Morphologisch konnten bei den Extrakten aus den bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit ähnliche Änderungen an den NuLi-1 Zellen wie nach achtwöchiger Wachstumszeit beobachtet werden (Abbildung 17).

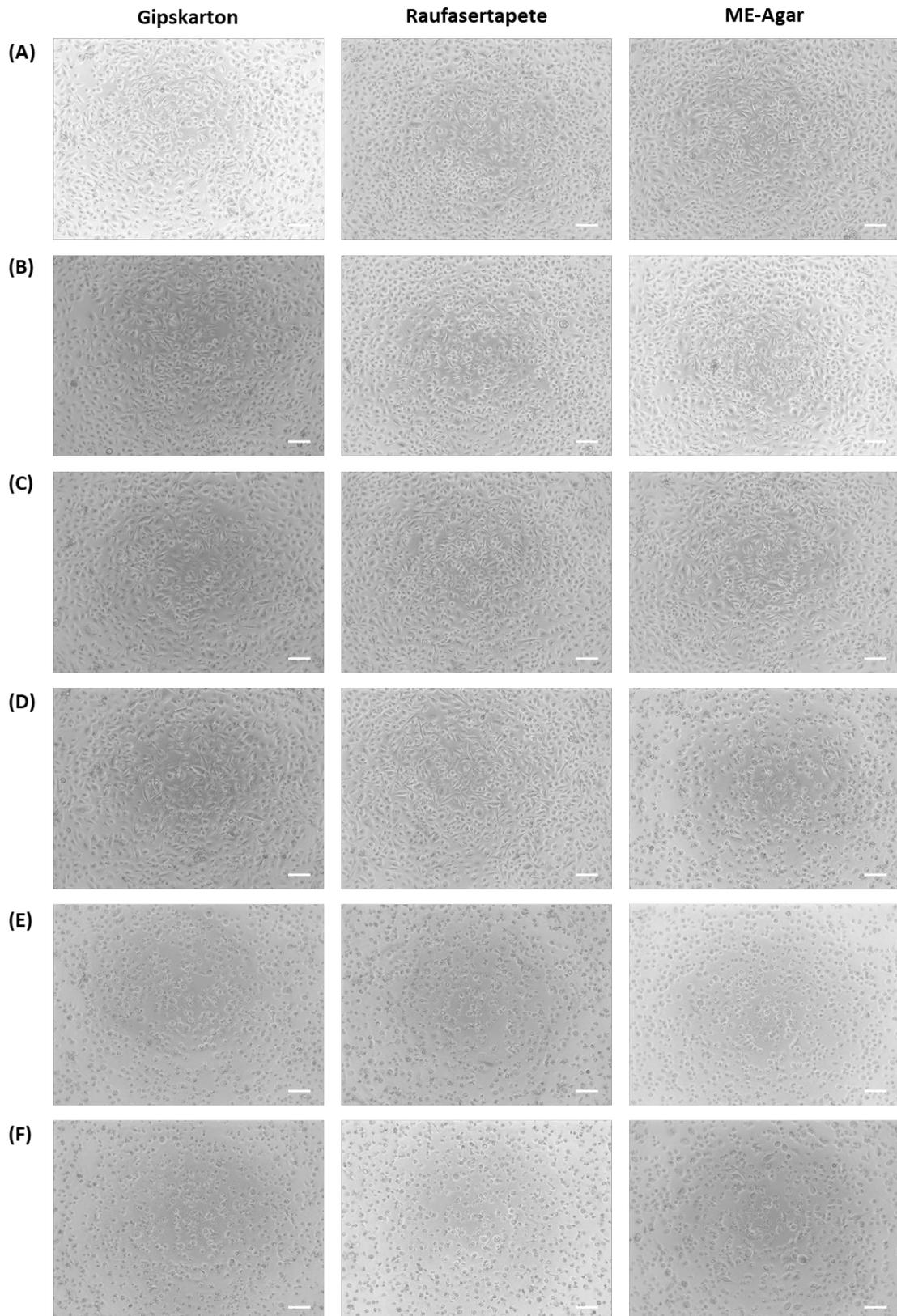
**Abbildung 16: Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); Als Kontrolle wurde die Zellviabilität der Extrakte aus den jeweiligen PBS behandelten Materialien verwendet; n=9; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

**Abbildung 17: Zellmorphologie der NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit**

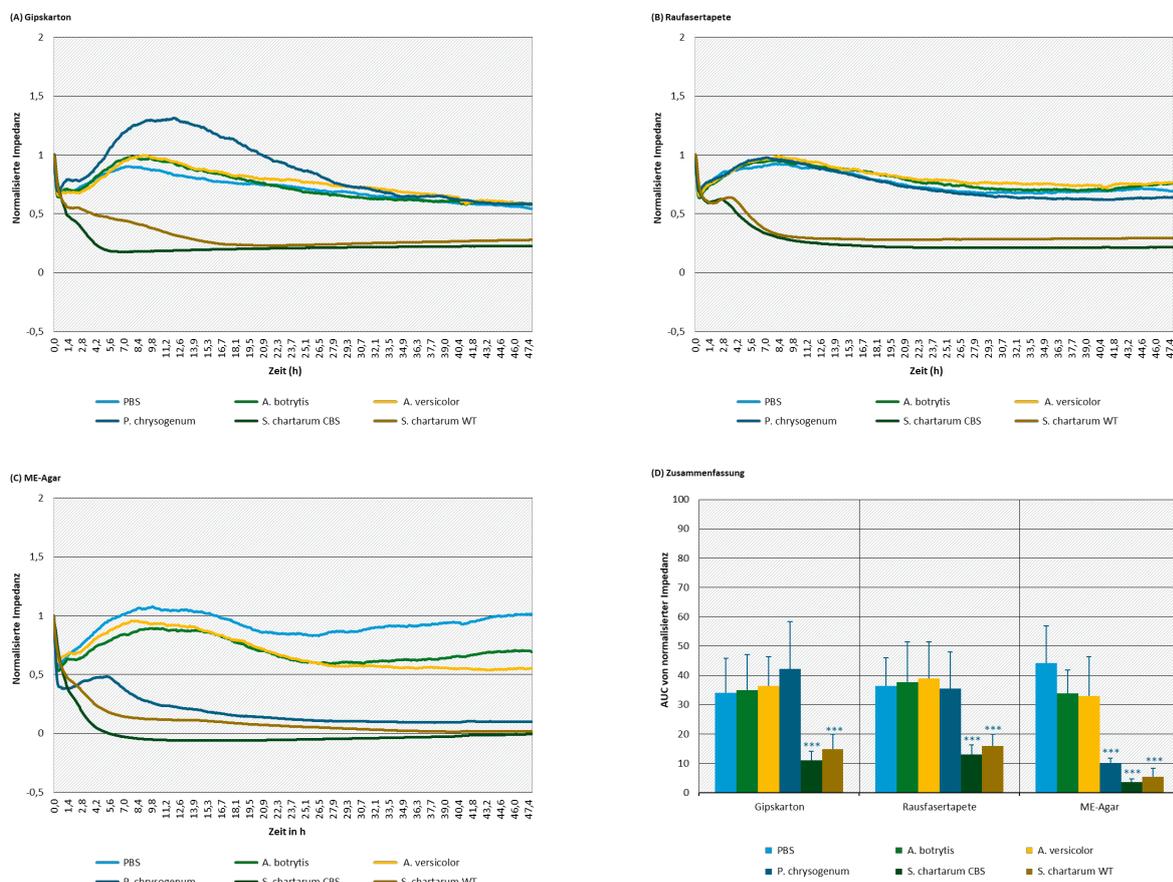


PBS (A), *A. botrytis* (B), *A. versicolor* (C), *P. chrysogenum* (D), *S. chartarum* CBS (E), *S. chartarum* WT (F); Maßstabsbalken entspricht 100 µm

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Um den Verlauf der Zellviabilitätsabnahme detaillierter und in Echtzeit zu untersuchen, wurden von den Extrakten aus Schimmelpilz-bewachsenen Materialien mit vierwöchiger Wachstumszeit zusätzlich Impedanz-basierte Messungen über einen Zeitraum von 48 h an NuLi-1 Zellen durchgeführt und anschließend nochmals die Zellviabilität bestimmt. Die Impedanzkurven sowie die ermittelten AUCs sind in Abbildung 18 dargestellt und spiegeln die Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen wider. Die Extrakte aus den mit *A. botrytis* und *A. versicolor* bewachsenen Materialien zeigten einen ähnlichen Verlauf der Impedanzkurven wie die Kontrolle (Extrakte aus den mit PBS behandelten Materialien). Die Extrakte aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenen Gipskarton und der Raufasertapete zeigten ebenfalls keine Unterschiede im Verlauf der Impedanzkurve zur Kontrolle. Bei der Exposition der Extrakte aus *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar nahm die Impedanz jedoch innerhalb der ersten 30 h langsam ab und stagnierte anschließend, womit die zytotoxischen Effekte widergespiegelt werden. Die Extrakte aller mit den beiden *S. chartarum* Stämmen bewachsenen Materialien führten sogar innerhalb der ersten 20 h zu einer Abnahme der Impedanz. Zudem war bei den Extrakten aus bewachsenen Gipskarton und ME-Agar eindeutig erkennbar, dass die Impedanz und somit auch die Zellviabilität bei *S. chartarum* CBS schneller abfiel als bei *S. chartarum* WT. Die ermittelten AUCs der normalisierten Impedanzkurven spiegeln die beschriebenen Kurvenverläufe entsprechend wider (Abbildung 18D). Statistisch signifikant verringerte AUCs verdeutlichen eine Reduktion in der Zellviabilität und demnach zytotoxische Effekte. Diese wurden ebenfalls bei den Extrakten aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenem ME-Agar sowie der Extrakte aller mit den beiden Stämmen von *S. chartarum* bewachsenen Materialien gezeigt.

**Abbildung 18: Zeitaufgelöste Impedanzmessungen von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien mit vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**

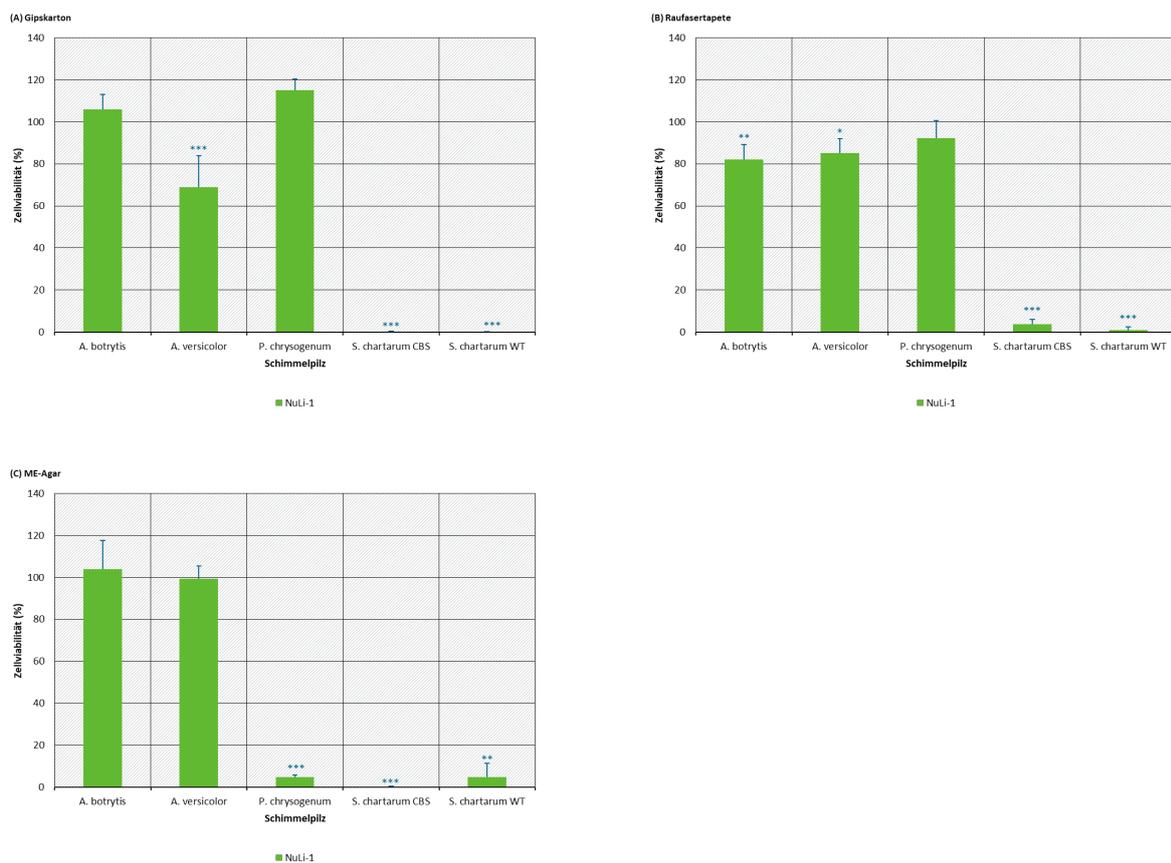


Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C), Fläche unter der normalisierten Impedanz-Kurve (D); n=9; Mittelwert (A-C); Mittelwert ± Standardabweichung (D); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Die normalisierten Kurven des Widerstandes zur Beurteilung der Barrierefunktion und der Kapazität zur Beurteilung der Zelladhärenz sowie die jeweils ermittelten AUCs sind im Anhang dargestellt (Abbildung 33, Abbildung 34). Sie zeigen wie die Impedanzmessungen eindeutige Unterschiede bei den Extrakten aus den mit *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar und den Extrakten aus den mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien. Dies deutet darauf hin, dass diese Extrakte sowohl die Barrierefunktion der NuLi-1 Zellen als auch die Zelladhärenz beeinträchtigen. Im Anschluss an die Impedanz-basierten Messungen wurde die Zellviabilität nach 48-stündiger Extraktexposition bestimmt (Abbildung 19). Die Reduktion der Zellviabilitäten, die bereits nach 24-stündiger Exposition detektiert wurden, waren nach 48 h ausgeprägter. Zusätzlich konnte bei den Extrakten aus den mit *A. versicolor* bewachsenen Gipskarton ein geringer Viabilitätsverlust nach 48 h nachgewiesen werden, der bisher nach 24 h nur bei den THP-1 Zellen nachweisbar war.

**Abbildung 19: Zellviabilitäten von NuLi-1 Zellen nach 48-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



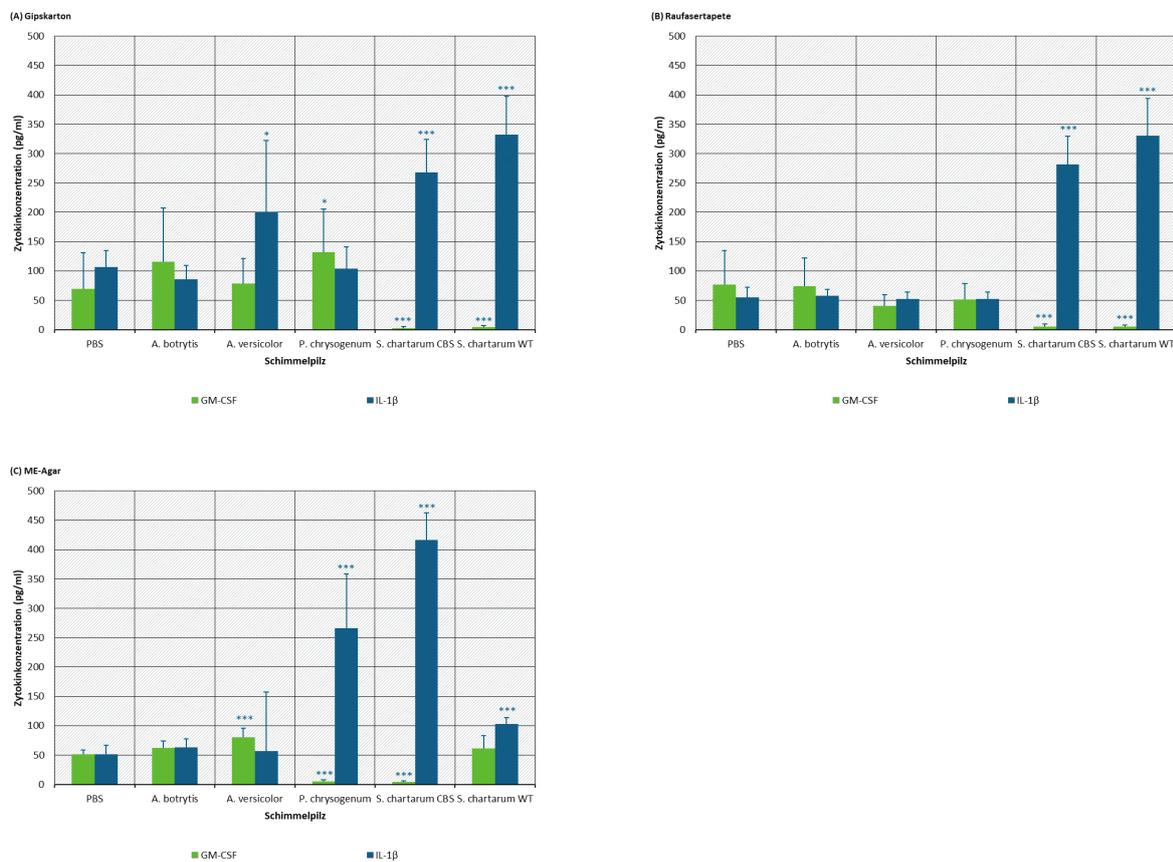
Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); Als Kontrolle wurde die Zellviabilität der Extrakte aus den jeweiligen PBS behandelten Materialien verwendet; n=3; Mittelwert ± Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.2.5 Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials nach vierwöchiger Wachstumszeit

Die bestimmten Zytokinkonzentrationen von GM-CSF und IL-1 $\beta$  nach Exposition der Zellen mit den Extrakten aus den Schimmelpilz-bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit zeigten im Vergleich zu den Extrakten nach achtwöchiger Wachstumszeit nur geringe Unterschiede (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 20). Zudem konnte nach der Exposition mit dem Extrakt aus den mit *A. versicolor* bewachsenen Gipskarton eine signifikant höhere IL-1 $\beta$  Freisetzung aus den THP-1 Makrophagen nachgewiesen werden. Zusammenfassend hatte die Wachstumszeit der Schimmelpilze auf den Materialien keinen erheblichen Einfluss auf das zytotoxische und immunmodulatorische Potential der Schimmelpilze, weshalb für weiterführende Experimente eine Wachstumszeit von vier Wochen verwendet wurde.

**Abbildung 20: Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) im Zellkulturmedium nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien mit einer vierwöchigen Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); n=9; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001  
Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.3 Untersuchung der Extrakte aus Oberflächenabstrichen von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien

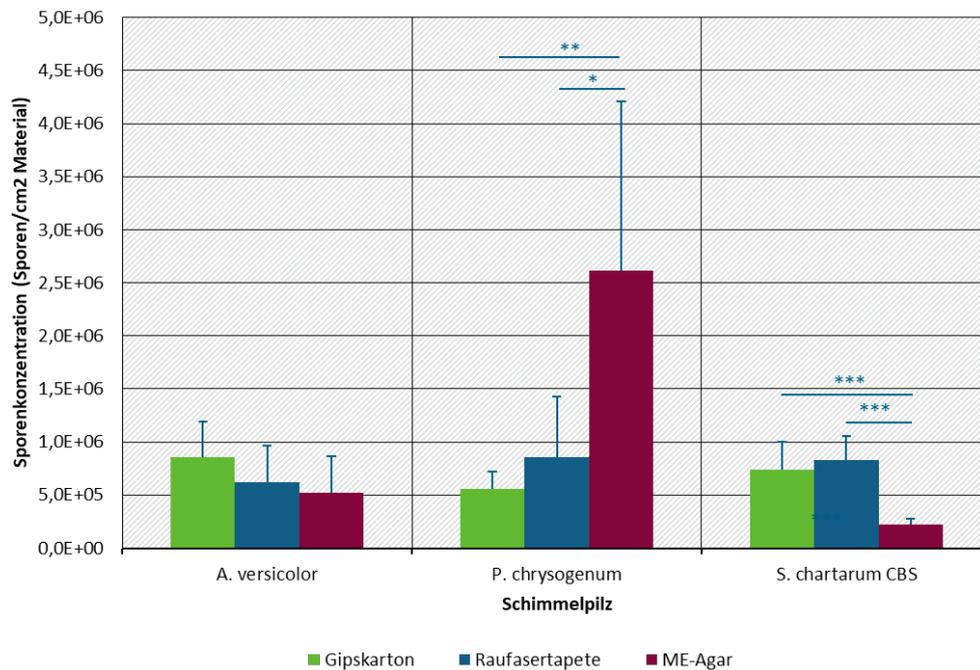
#### 3.3.1 Bestimmung der Sporenkonzentrationen der Oberflächenabstriche von Schimmelpilz-bewachsener Materialien

In einem zweiten Ansatz wurde das zytotoxische und immunmodulatorische Potential von Extrakten aus Oberflächenabstrichen von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien untersucht. Hierbei wurden drei der fünf vorgestellten Schimmelpilze verwendet: *A. versicolor*, *P. chrysogenum* und *S. chartarum* CBS. Die anderen beiden Schimmelpilze wurden nicht weiter untersucht, da *A. botrytis* bei allen Extrakten aus den bewachsenen Materialien keine zytotoxischen und immunmodulatorischen Effekte zeigte und ihm vorrangig eine sensibilisierende Wirkung zugeschrieben wird. Um die Probenanzahl weiter zu reduzieren, wurde sich nur auf einen Stamm von *S. chartarum* fokussiert. Für die Bestimmung der Sporenkonzentrationen in den Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien wurde mittels eines Wattestäbchens Sporen und weitere Schimmelpilzbestandteile von der bewachsenen Materialoberfläche abgelöst und in Lösung gebracht (vgl. Abschnitt 2.1.3.5). Von dieser wurden die Sporenkonzentrationen mikroskopisch bestimmt, dessen Ergebnisse in Tabelle 4 und in Abbildung 21 dargestellt sind. Bei allen mit *A. versicolor* bewachsenen Materialoberflächen konnte eine ähnliche Sporenkonzentration abgelöst werden. Bei den mit *P. chrysogenum* und *S. chartarum* CBS bewachsenen Gipskarton- und Raufasertapetenoberflächen konnten Sporenkonzentrationen im ähnlichen Größenbereich wie bei den mit *A. versicolor* bewachsenen Materialoberflächen abgelöst werden. Von der mit *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agaroberfläche wurde jedoch eine statistisch signifikant höhere Sporenkonzentration im Vergleich zur bewachsenen Gipskarton- und Raufasertapetenoberfläche erhalten. Im Gegensatz dazu konnte von der mit *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agaroberfläche eine statistisch signifikant geringere Sporenkonzentration als von der bewachsenen Gipskarton- und Raufasertapetenoberfläche erhalten werden. Ob die unterschiedlichen Sporenkonzentrationen einen Einfluss auf das zytotoxische und immunmodulatorische Potential haben, wird in den nächsten Kapiteln näher beschrieben.

**Tabelle 4: Sporenkonzentrationen der Oberflächenabstriche von Schimmelpilz-bewachsener Materialien**

Sporen/cm <sup>2</sup> Material	Gipskarton	Raufasertapete	ME-Agar
<i>A. versicolor</i>	8,6x10 <sup>5</sup> ± 3,4x10 <sup>5</sup>	6,2x10 <sup>5</sup> ± 3,4x10 <sup>5</sup>	5,2x10 <sup>5</sup> ± 3,4x10 <sup>5</sup>
<i>P. chrysogenum</i>	5,5x10 <sup>5</sup> ± 1,7x10 <sup>5</sup>	8,6x10 <sup>5</sup> ± 5,7x10 <sup>5</sup>	2,6x10 <sup>6</sup> ± 1,6x10 <sup>6</sup>
<i>S. chartarum</i> CBS	7,4x10 <sup>5</sup> ± 2,6x10 <sup>5</sup>	8,3x10 <sup>5</sup> ± 2,7x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>5</sup> ± 6,2x10 <sup>5</sup>

**Abbildung 21: Sporenkonzentrationen nach Oberflächenabstrich von der bewachsenen Materialoberfläche in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



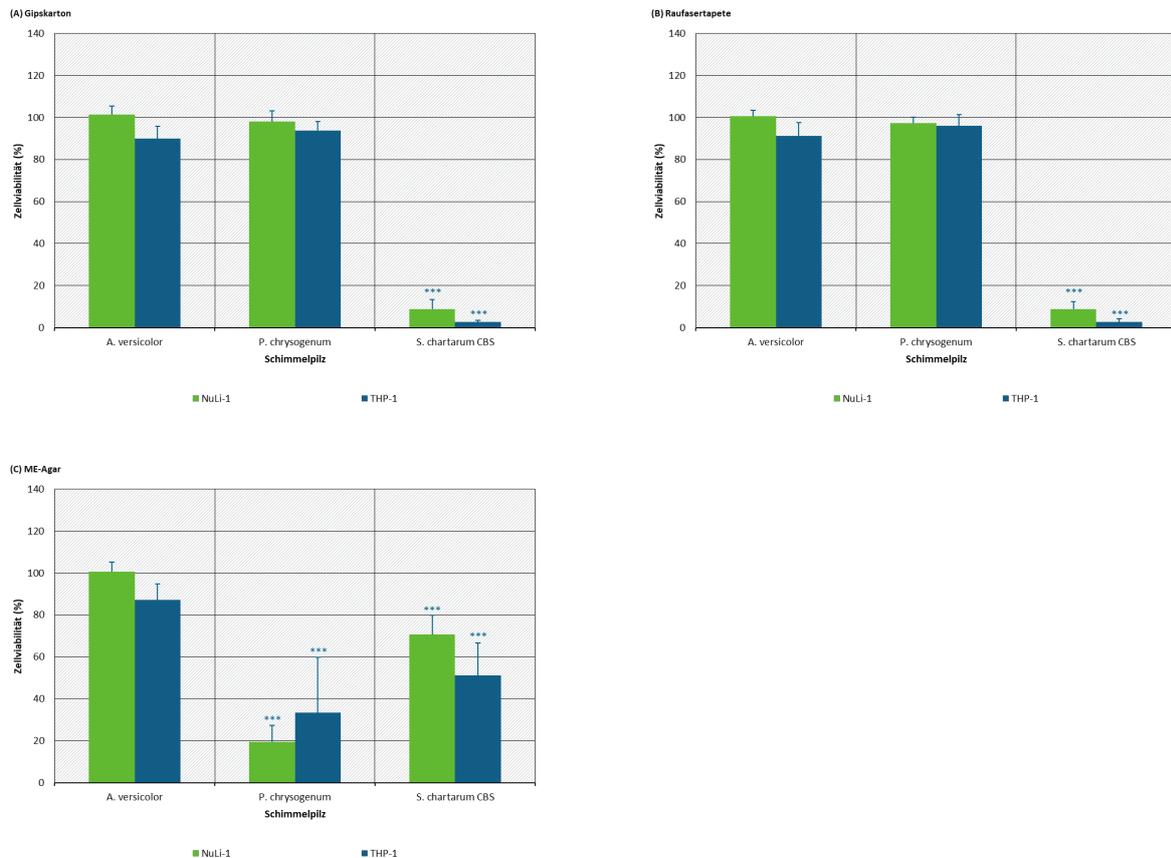
n=9; Mittelwert ± Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.3.2 Bestimmung des zytotoxischen Potentials

Zur Untersuchung des zytotoxischen Potentials wurden NuLi-1 und THP-1 Zellen gegenüber den Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den Schimmelpilz-bewachsenen Materialien für 24 h exponiert und deren Zellviabilität bestimmt. Außerdem wurde die Wirkung der Extrakte über einen Zeitraum von 48 h an NuLi-1 Zellen mittels Impedanz-basierter Messung in Echtzeit analysiert sowie anschließend die Zellviabilität nach 48 h bestimmt. Diese Extrakte zeigten ein ähnliches zytotoxisches Potential wie die Extrakte aus den Schimmelpilz-bewachsenen Materialien (Abbildung 22). Alle Extrakte aus Oberflächenabstrichen der mit *A. versicolor* bewachsenen Materialien wiesen keine zytotoxische Wirkung auf und hatten keinen Einfluss auf die Impedanz der Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Extrakte aus Oberflächenabstrichen der mit PBS behandelten Materialien) (Abbildung 23). Die Extrakte aus Oberflächenabstrichen des mit *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agars zeigten bei NuLi-1 und THP-1 Zellen ebenfalls einen Viabilitätsverlust. Dieser spiegelte sich in einer geringeren Impedanz im Vergleich zur Kontrolle aber auch zu den Extrakten aus Oberflächenabstrichen des bewachsenen Gipskartons und der Raufasertapete wider. Die Extrakte aus Oberflächenabstrichen der mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien zeigten, wie die Extrakte aus den mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien, eine starke Reduktion der Zellviabilität beim Gipskarton und der Raufasertapete, was auch an der abnehmenden Impedanzkurve erkennbar ist. Im Vergleich zu den Extrakten aus den bewachsenen Materialien ist die Impedanzabnahme über den gesamten Messzeitraum jedoch langsamer, was auf eine schwächere zytotoxische Wirkung der Extrakte aus Oberflächenabstrichen der bewachsenen Materialien hinweist.

**Abbildung 22: Zellviabilitäten von NuLi-1 und THP-1 Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



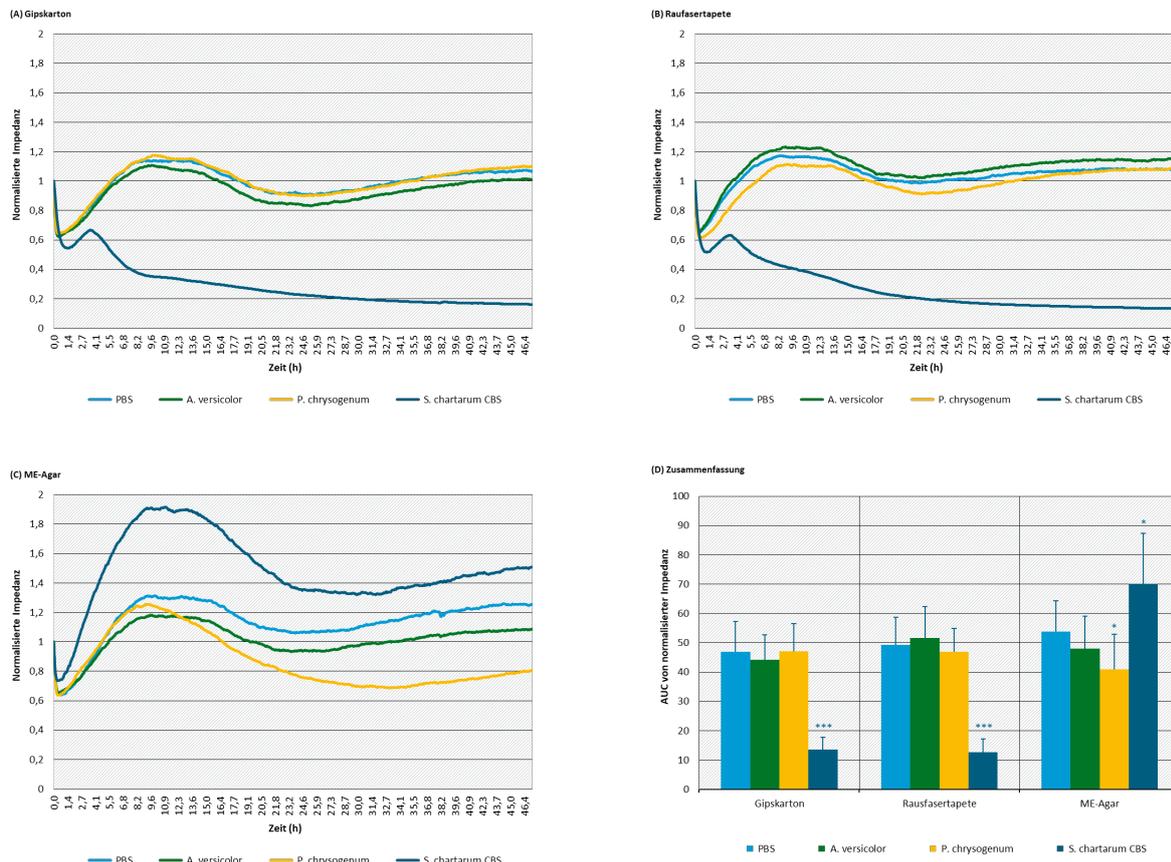
Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); Als Kontrolle wurde die Zellviabilität der Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den jeweiligen mit PBS behandelten Materialien verwendet; n=9; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Die Exposition der Zellen mit den Extrakten aus Oberflächenabstrichen des mit *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agars führte zunächst zu einem Anstieg der Impedanzkurve, welcher nach ca. 15 h wieder abnahm (Abbildung 23C). Die ermittelte AUC der normalisierten Impedanzkurve war bei diesen Extrakten auch deutlich höher als die AUC der jeweiligen PBS Kontrolle und von den Extrakten aus Oberflächenabstrichen des bewachsenen Gipskartons und der Raufasertapete. Die Viabilitätsuntersuchungen zeigten nach Exposition des Extraktes aus Oberflächenabstrichen des mit *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agars bei beiden Zelllinien ebenfalls einen geringeren Viabilitätsverlust als bei den Extrakten aus Oberflächenabstrichen des bewachsenen Gipskartons und der Raufasertapete (Abbildung 22C). Die normalisierten Widerstands- und Kapazitätskurven sowie die jeweils berechneten AUCs werden ebenfalls im Anhang zur Vervollständigung der Daten aufgeführt (Abbildung 35, Abbildung 36). Auch hier kann von einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion und auch der Zelladhärenz ausgegangen werden. Die Extrakten aus Oberflächenabstrichen der Schimmelpilz-bewachsenen Materialien, die keine zytotoxischen Wirkungen zeigten, wiesen keine morphologisch sichtbaren Zellveränderungen im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 24). Die Extrakten aus Oberflächenabstrichen aus bewachsenen Materialien mit einer zytotoxischen Wirkung wiesen ähnliche morphologische Änderungen wie die Extrakten aus den bewachsenen Materialien auf.

Sie zeigten einen runden Habitus der NuLi-1 Zellen sowie eine lückenhafte Zellschicht. Nach der Exposition der Extrakte aus Oberflächenabstrichen des mit *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agars war hingegen noch eine intakte konfluente Zellschicht vorhanden, innerhalb der NuLi-1 Zellen war jedoch eine Akkumulation von Pigmenten erkennbar.

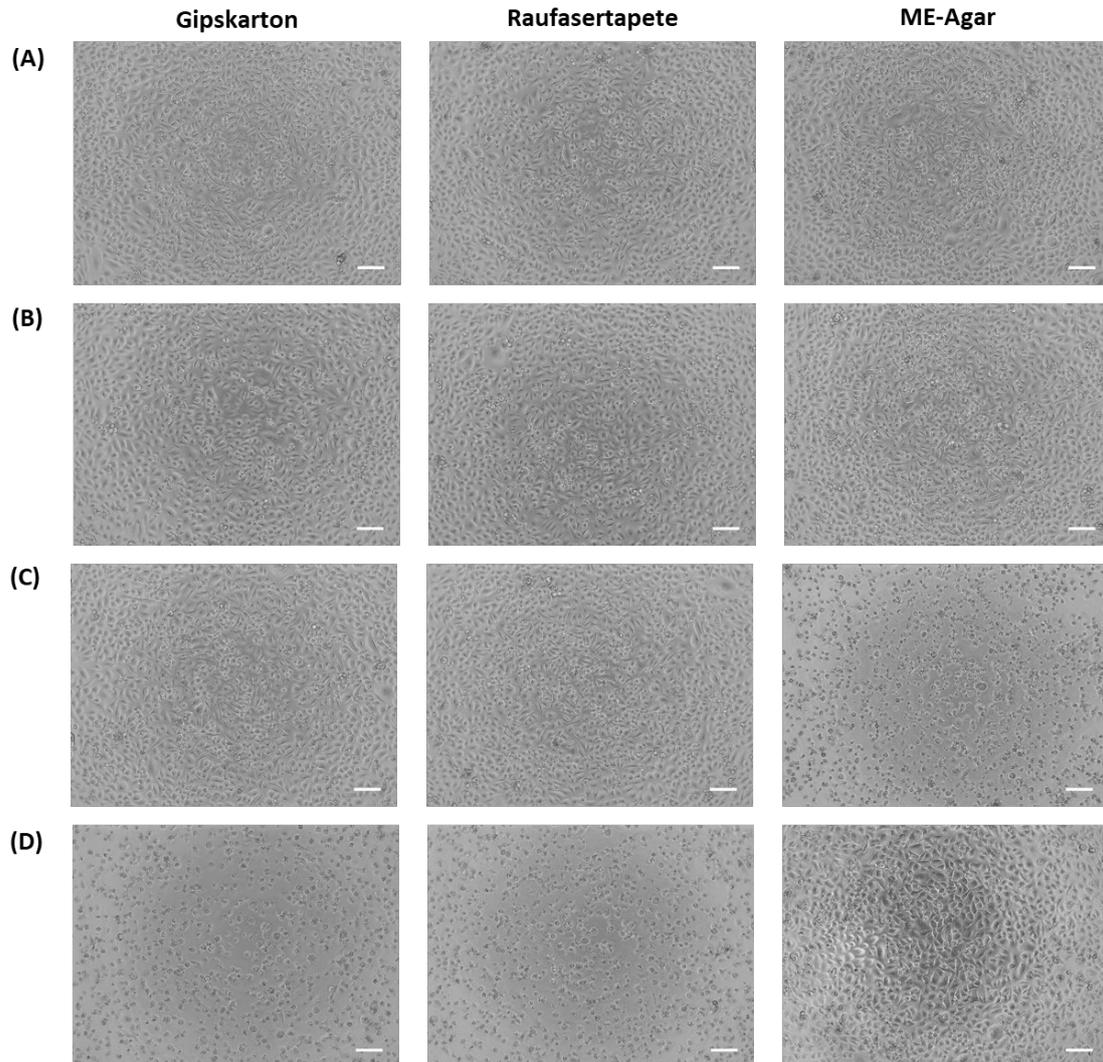
**Abbildung 23: Zeitaufgelöste Impedanzmessungen von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C), Fläche unter der normalisierten Impedanz-Kurve (D); n=9; Mittelwert (A-C); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (D); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

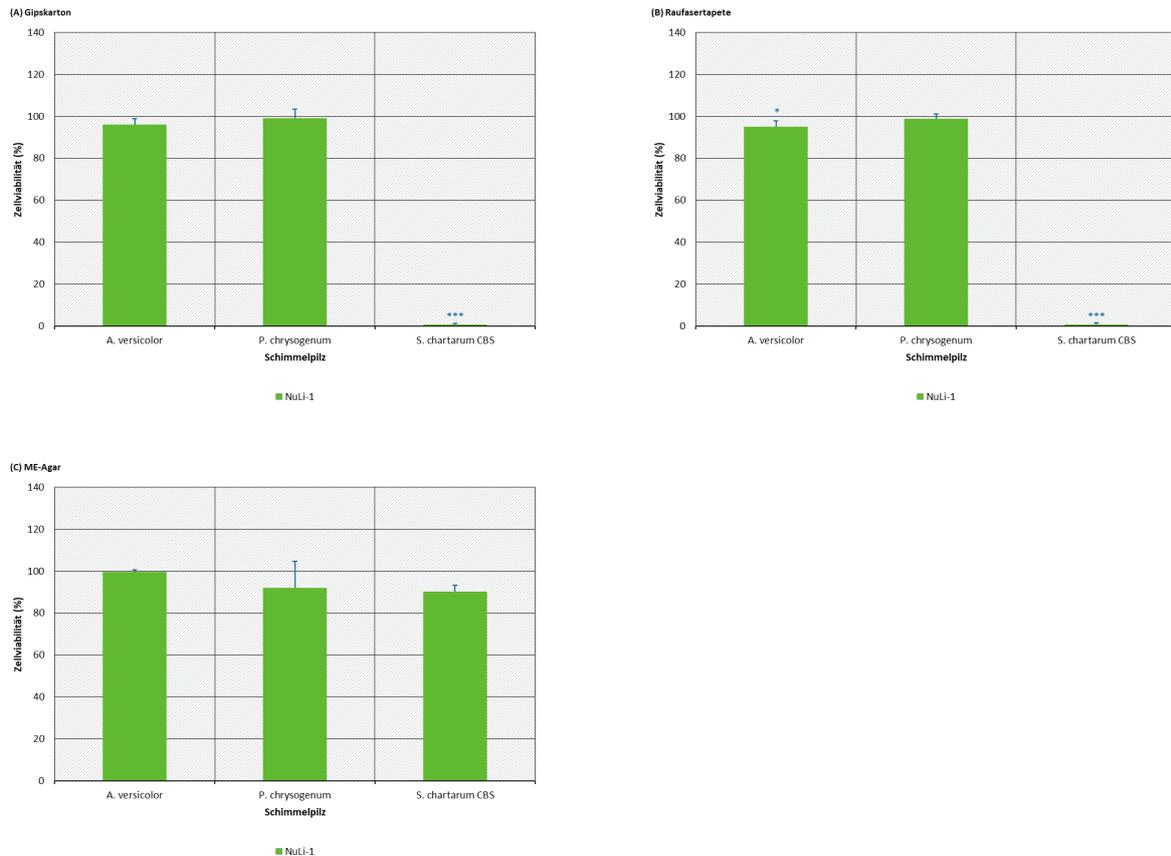
**Abbildung 24: Zellmorphologie der NuLi-1 Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



PBS (A), *A. versicolor* (B), *P. chrysogenum* (C), *S. chartarum* CBS (D), Maßstabsbalken entspricht 100 µm  
 Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Analog zu den Extrakten aus den bewachsenen Materialien erhöhte sich die zytotoxische Wirkung der Extrakte aus *S. chartarum* CBS bewachsener Gipskarton- und Raufasertapetenoberfläche nach 48-stündiger Exposition (Abbildung 25). Auffällig bei den Extrakten aus *P. chrysogenum* und *S. chartarum* CBS bewachsener ME-Agaroberfläche war jedoch, dass die zytotoxische Wirkung von 24 h bis 48 h wieder abnahm, das auch an dem Kurvenverlauf der Impedanzmessung deutlich erkennbar ist.

**Abbildung 25: Zellviabilitäten der NuLi-1 Zellen nach 48-stündiger Exposition der Extrakte aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); Als Kontrolle wurde die Zellviabilität der Extrakte aus Oberflächenabstrichen von den jeweiligen mit PBS behandelten Materialien verwendet; n=3; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

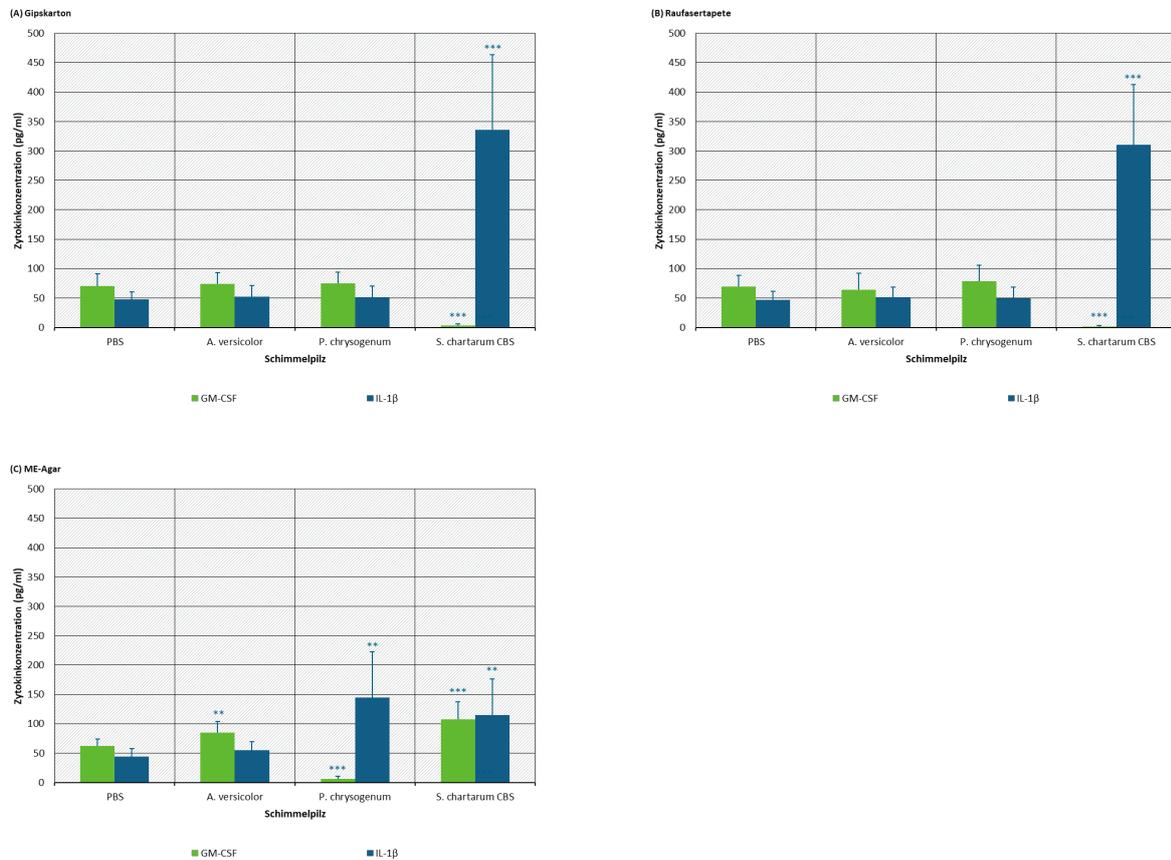
Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.3.3 Bestimmung des immunmodulatorischen Potentials

Auch die Untersuchung der immunmodulatorischen Eigenschaften nach Exposition der Zellen mit den Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den Schimmelpilz-bewachsenen Materialien zeigte, dass die Extrakte mit einer zytotoxischen Wirkung ebenfalls zu einer geringeren Konzentration des Zytokins GM-CSF aus den NuLi-1 Zellen sowie zu einer höheren IL-1 $\beta$  Konzentration aus den THP-1 Makrophagen im Vergleich zur Kontrolle führten (Abbildung 26). Eine Ausnahme bildeten die Extrakte aus Oberflächenabstrichen des mit *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agars. Hier konnte eine höhere GM-CSF Konzentration im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Der Vergleich der Extrakte zeigte, dass sowohl Extrakte aus dem gesamten Material als auch aus Oberflächenabstrichen der Materialein ähnliche zytotoxische und immunmodulatorische Wirkungen aufwiesen, wobei die Extrakte aus Oberflächenabstrichen zum Teil etwas schwächere Effekte hervorriefen. Dies deutet darauf hin, dass die zytotoxische und immunmodulatorische Wirkung vorrangig von Schimmelpilzbestandteilen stammt, die sich auf der Materialoberfläche befinden und mittels eines Wattestäbchens abgelöst werden können. Da unter realen Bedingungen im Innenraum die Schimmelpilzbestandteile von der Oberfläche zunächst in die Luft gelangen müssen um eingeatmet zu werden, wurden Bioaerosole mit einem Versuchsaufbau erzeugt. Die Bioaerosole

wurden auf Filtern gesammelt, aus denen Extrakte hergestellt und diese dann anschließend untersucht wurden. Die Ergebnisse werden im nächsten Kapitel dargestellt.

**Abbildung 26: Zytokinkonzentrationen (GM-CSF, IL-1 $\beta$ ) nach 24-stündiger Exposition der Extrakte aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C); n=9; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001  
 Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

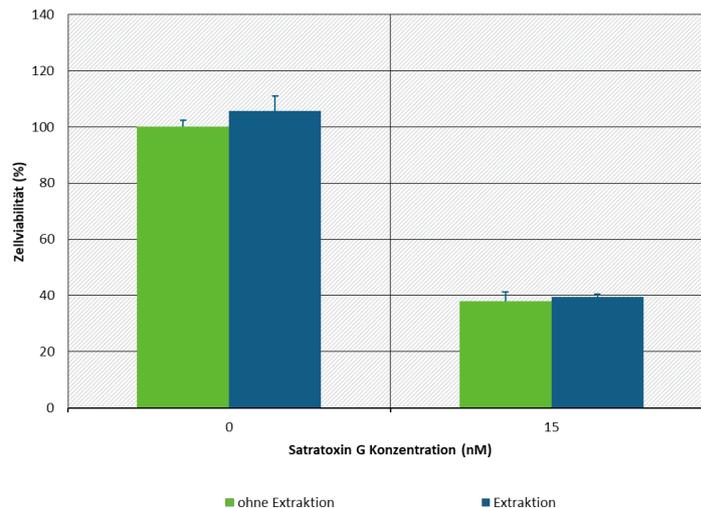
### 3.4 Untersuchung der Aerosolisierung und der Extrakte aus aerosolisierten Schimmelpilzpartikeln

#### 3.4.1 Mykotoxinextraktion aus Filter

Für die Untersuchung der Aerosolisierung von Partikeln von Schimmelpilz-bewachsenen Materialien wurden ausschließlich *S. chartarum* CBS bewachsene Materialien verwendet, da von diesem Schimmelpilz nachweislich zytotoxische Wirkungen ausgehen können. Zunächst wurde eine Sammelmethode etabliert, mit der die freigesetzten Schimmelpilzbestandteile auf Quarzfaserfiltern gesammelt werden können. Zur Überprüfung der Eignung der Methode wurde Satratoxin G als repräsentatives Mykotoxin von *S. chartarum* in einer Konzentration von 15 nM auf die Filter gegeben und extrahiert. Es folgte eine Exposition von NuLi-1 Zellen mit den Extrakten mit anschließender Bestimmung der Zellviabilität im Vergleich zu einer Satratoxin G Lösung gleicher Konzentration ohne vorherige Extraktion. Die Extrakte aus den Quarzfaserfiltern zeigten im Vergleich zur Satratoxin G Lösung ähnliche Zellviabilitäten (Abbildung 27). Quarzfaserfilter haben weiterhin den Vorteil, dass sie hitzesterilisierbar und beständig gegen Lösungsmittel wie Methanol sind, das für die Extraktionsmethode notwendig

ist. Sie sind zudem für die Luftstaubanalytik geeignet und 99,9 % der Partikel, die kleiner als 0,3 µm sind, können mit diesen Filtern gesammelt werden. Da Mykotoxine unter realen Bedingungen jedoch nicht in Lösung, sondern entweder an Materialien anhaften oder in Aerosolen vorkommen, sollten weiterführend Aerosolisierungsexperimente zur Bestimmung der Wiederfindungsrate durchgeführt werden. Hierzu sollten Mykotoxinlösungen vernebelt werden, um die Realsituation besser zu imitieren. Außerdem könnten weitere Sammelmethode n z.B. mittels Impinger ausgetestet werden.

**Abbildung 27: Zellviabilitäten von NuLi-1 Zellen nach Exposition gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Satratoxin G Lösungen nach Aufbringung auf Quarzfaserfiltern**



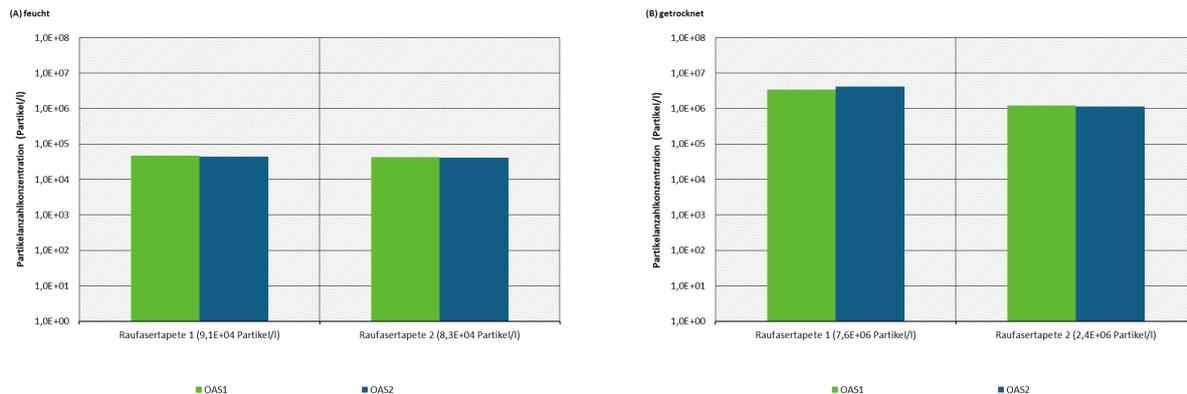
Als Kontrolle wurde die Zellviabilität von Satratoxin G Lösung ohne Extraktion in der jeweiligen Konzentration verwendet n=3; Mittelwert ± Standardabweichung

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

### 3.4.2 Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Aerosolisierung von Schimmelpilzpartikeln

Um Schimmelpilzbestandteile von den bewachsenen Materialien freizusetzen und in die Luft zu bringen (Aerosolisierung) wurde ein Versuchsaufbau entwickelt und etabliert. Dieser ist im Material- und Methodenteil (vgl. Abschnitt 2.1.3.6) beschrieben. Die Untersuchung der Verteilung der Partikelanzahlkonzentrationen an zwei verschiedenen Stellen (Mitte und Ende) innerhalb der Homogenisierungskammer zeigte bei der feuchten und getrockneten mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Raufasertapete vergleichbare Ergebnisse, so dass von einer gleichmäßigen Partikelverteilung innerhalb der Kammer ausgegangen werden kann und somit die Sammelposition in der Kammer keinen Einfluss auf die gesammelte Partikelmenge haben sollte. Für die weiterführenden Untersuchungen wurden die aerosolisierten Partikel daher am Ende der Kammer gesammelt. Weiterhin konnten bei diesen Untersuchungen eindeutige Unterschiede in der freigesetzten Partikelanzahlkonzentration zwischen feuchter und getrockneter mit *S. chartarum* CBS bewachsener Raufasertapete gezeigt werden. Von der getrockneten bewachsenen Raufasertapete konnten bis zu 100-fach mehr Partikel als von der feuchten bewachsenen Raufasertapete mit dem etablierten Versuchsaufbau aerosolisiert werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass eine geringere Feuchtigkeit in den Materialien, z.B. durch Trocknung, zu einer verbesserten Aerosolisierung von Schimmelpilzpartikeln führt.

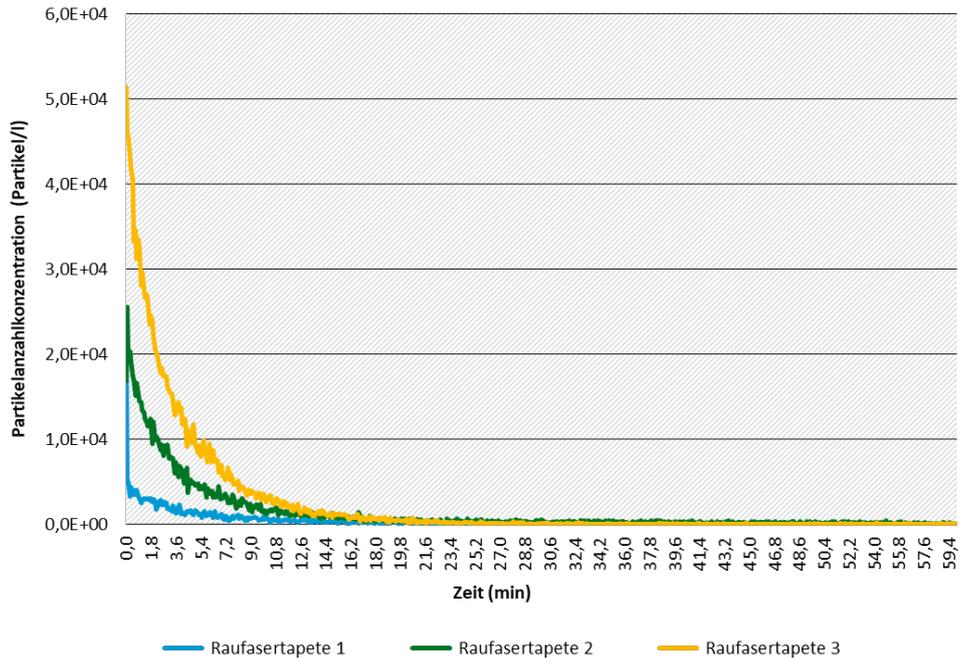
**Abbildung 28: Partikelanzahlkonzentrationen in der Homogenisierungskammer während der Aerosolisierung ausgehend von feuchter und getrockneter mit *S. chartarum* CBS bewachsener Raufasertapete**



Feuchte mit *S. chartarum* CBS bewachsene Raufasertapete (A), getrocknete mit *S. chartarum* CBS bewachsene Raufasertapete (B); OAS1 befand sich am Ende der Kammer und OAS2 in der Mitte der Kammer; n=2 (Einzelmessungen)  
Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

Für die finale Überprüfung der Aerosolisierungs- und Sammelmethode wurden drei getrocknete mit *S. chartarum* CBS bewachsene Raufasertapetenstücke mit dem etablierten Versuchsaufbau aerosolisiert und die freigesetzten Partikel einerseits mittels OAS detektiert und andererseits auf einem Quarzfaserfilter gesammelt. Es konnte eine eindeutige Partikelfreisetzung von den drei mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Raufasertapetenstücken nachgewiesen werden. Die höchsten Partikelanzahlkonzentrationen wurden hierbei zu Messbeginn detektiert, die dann innerhalb von 20 min kontinuierlich abnahmen (Abbildung 29). Es wurden überwiegend Partikel mit einem optischen Latex-Äquivalenzdurchmesser von 0,3 µm bis 4,1 µm detektiert, aber nur wenige Partikel in höheren Größenbereichen (Abbildung 30). Von den Quarzfaserfiltern wurden Extrakte nach der etablierten Extraktionsmethode gewonnen. Die anschließende Exposition dieser Aerosolextrakte gegenüber beiden Zelllinien resultierten in eine Reduzierung der Zellviabilität auf 35,8 % bei NuLi-1 Zellen und 0,6 % bei THP-1 Makrophagen. Die gesammelten Partikel auf dem Quarzfaserfilter wiesen somit eine zytotoxische Wirkung auf. Mit dieser Methode ist der Nachweis gelungen, dass das Prinzip des etablierten Versuchsaufbaus und der etablierten Sammelmethode geeignet ist, um Schimmelpilzpartikel und möglicherweise Mykotoxine von der Oberfläche Schimmelpilz-bewachsener Materialien freizusetzen und auf Quarzfaserfiltern zu sammeln, um daraus Extrakte für die anschließende zytotoxische und immunmodulatorische Analyse herstellen zu können.

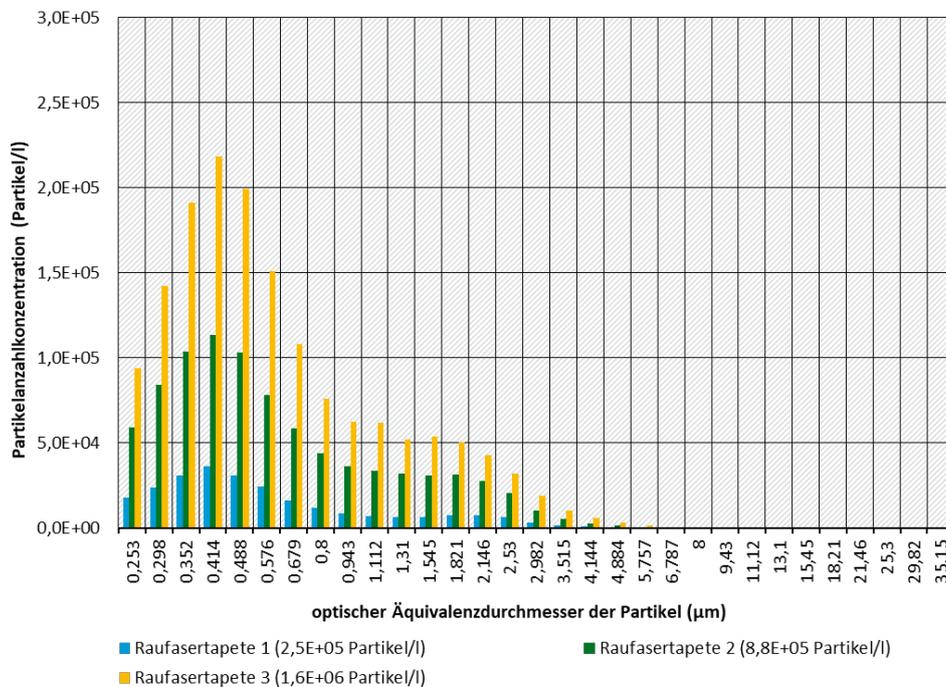
**Abbildung 29: Zeitaufgelöster Verlauf der Partikelanzahlkonzentration von der Aerosolisierung von getrockneter mit *S. chartarum* CBS bewachsener Raufasertapete**



n=3 (Einzelmessungen)

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

**Abbildung 30: Größenverteilung der freigesetzten Partikel während der Aerosolisierung von getrockneter mit *S. chartarum* CBS bewachsener Raufasertapete**



n=3 (Einzelmessungen)

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

## 4 Diskussion

### 4.1 Gesundheitliche Wirkungen bei Schimmelbefall

#### 4.1.1 Testsysteme

Nach dem heutigen Forschungsstand ist es noch nicht möglich, die dosisbezogenen Gesundheitsrisiken zu quantifizieren, die auf Schimmel in Innenräumen zurückzuführen sind, um die Festlegung spezifischer gesundheitsbezogener Grenzwerte für Schimmel zu unterstützen. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes sollte ein wirkungsbasiertes Testsystem entwickelt werden, um das zytotoxische und immunmodulatorische Potential von Schimmelpilzbestandteilen an der humanen bronchialen Lungenepithelzelllinie NuLi-1 und der humanen monozytären Zelllinie THP-1 zu untersuchen. Hierbei wurden sowohl Schimmelpilzsporensuspensionen als auch verschiedene Extrakte verwendet, die aus Schimmelpilz-bewachsenen Innenraummaterialien hergestellt wurden und verschiedene Metabolite, wie z.B. Mykotoxine, beinhalten können. In bisherigen Untersuchungen zu den gesundheitlichen Wirkungen von Innenraumschimmel wurden entweder die Sporen in aktiver oder inaktiver Form, die Hyphen (Øya et al., 2019), die produzierten Metabolite durch Herstellung von Extrakten oder deren Kombination an verschiedenen Zellsystemen analysiert (Holme et al., 2020; Kováčiková et al., 2007; Kováčiková et al., 2008). So untersuchte Huttunen *et al.* das zytotoxische und inflammatorische Potential von Schimmelpilzsporen und bakteriellen Sporen, die aus Haushalten mit Schimmelbefall isoliert wurden, an der humanen Epithelzelllinie A549 sowie an humanen und murinen Makrophagen-Zelllinien (Huttunen et al., 2003). Hierbei zeigte sich, dass die Schimmelpilzsporen zu keiner eindeutigen Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Konzentration oder Zytokinfreisetzung führten, außer für *S. chartarum* konnte eine erhöhte Interleukin-6 Produktion nachgewiesen werden. Zudem zeigten die humanen Zellen eine geringere Zytotoxizität im Vergleich zu den murinen Zellen, was auf Reaktionsunterschiede zwischen den Spezies hindeutet und eine notwendige Verwendung von humanen Zellsystemen für solche Untersuchungen deutlich macht (Movia et al., 2020). In der Studie von Kováčiková *et al.* wurden sowohl Endometabolite aus dem Myzel als auch Exometabolite aus dem Kulturmedium an drei tierischen Zelllinien aus der Lunge analysiert: Epitheltyp II Zellen und alveolare Makrophagen aus Wistar-Ratten sowie eine murine Clara-Zelllinie (Kováčiková et al., 2008). In dieser Studie wurde ebenfalls das zytotoxische und inflammatorische Potential der Metabolite von *A. versicolor*, *A. ustus*, *P. chrysogenum* und *S. chartarum* untersucht. Die Untersuchungen zeigten ähnlich zu unseren Ergebnissen, dass die Metabolite von *S. chartarum* die höchste Zytotoxizität von den untersuchten Schimmelpilzen aufwiesen. Zudem wurden Änderungen an der Zelloberfläche über die Bestimmung von Lectin an den Epithel Typ II Zellen sowie in der Aktivität des lysosomalen Enzyms Saure Phosphatase in den alveolaren Makrophagen festgestellt. Die untersuchten Endo- und Exometabolite wurden bei Piecková und Kolláriková an Trachealorgankulturen von einem Tag alten Küken exponiert, um die Zilienschlagfrequenz im trachealen Epithelium zu analysieren (Piecková & Kolláriková, 2008). Auch dreidimensionale Zellkulturen, wie Air-Liquid-Interface Zellkulturen der Lunge, stellen demnach eine Möglichkeit zur Untersuchung gewebeähnlicher Strukturen dar, womit weitere Endpunkte, wie die Histologie oder Zilienschlagfrequenz der Lunge untersucht und somit humanrelevante gesundheitliche Effekte genauer betrachtet werden können (Da Silva Costa et al., 2021).

#### 4.1.2 Zytotoxisches Potential von Schimmelpilzen

Mit dem entwickelten Testsystem konnten zytotoxische und immunmodulatorische Wirkungen bei allen Extrakten aus *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien und Materialoberflächen sowie Extrakten aus *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar detektiert werden. Schimmelpilze können zytotoxische Wirkungen durch die Produktion von Mykotoxinen, Proteasen und weiteren Nebenprodukten hervorrufen, wobei Mykotoxine einen großen Einfluss zugeschrieben wird (Holme et al., 2020). Mykotoxine sind eine heterogene Gruppe überwiegend niedrig-molekularer Substanzen, die in geringen Konzentrationen toxische Wirkungen auf Menschen und Tiere zeigen (Bennett & Klich, 2003; Zain, 2011). Sie werden als Sekundärmetabolite unter bestimmten Wachstumsbedingungen von unterschiedlichen Schimmelpilzarten produziert (Hardin et al., 2003; Mazur & Kim, 2006). Ein Schimmelpilz kann mehrere Mykotoxine bilden und ein Mykotoxin kann wiederum von verschiedenen Schimmelpilzen gebildet werden (Awuchi et al., 2022; Mazur & Kim, 2006). Da die von *S. chartarum* produzierten Mykotoxine zu den toxischsten ihrer Art gehören, kann dies die nachweislich hohen Zytotoxizitäten sowohl bei den Extrakten aus den bewachsenen Materialien als auch aus den bewachsenen Materialoberflächen erklären. *S. chartarum* produziert Typ D Trichothecene, welche makrozyklische Sesquiterpene sind und zu denen Satratoxin G, Satratoxin F, Satratoxin H, Verrucaridin J sowie Roridin E und Roridin L2 gehören (Köck, 2022; Pei & Gunsch, 2013). Typ D Trichothecene können irreversibel an die 60S ribosomale Untereinheit binden und hierdurch die Translation der mRNA zu Proteinen inhibieren, wodurch die Zellen letztendlich sterben (Shifrin & Anderson, 1999). Kankkunen *et al.* zeigte an THP-1 Makrophagen, dass die Exposition von Satratoxin positiven *S. chartarum* Sporen als auch individuelle Trichothecene zur Aktivierung der Caspase-3 führen, die am programmierten Zelltod, der Apoptose, beteiligt ist und einen möglichen Wirkmechanismus für die zytotoxischen Effekte in den THP-1 Makrophagen darstellt (Kankkunen et al., 2009). Die Ergebnisse der Extrakte aus *S. chartarum* CBS bewachsener ME-Agaroberfläche wiesen im Vergleich zu den Extrakten aus der Gipskarton- bzw. Raufasertapetenoberfläche eine geringere Zytotoxizität auf und deuten auf einen anderen Wirkmechanismus hin. Die Impedanzzunahme (vgl. Abbildung 23C) nach der Exposition der Extrakte aus *S. chartarum* CBS bewachsener ME-Agaroberfläche könnte auf eine Schwellung der NuLi-1 Zellen und dem damit verbundenen nekrotischen Zelltod hindeuten. An diesem Beispiel wird deutlich, dass durch die Verwendung von zeitaufgelösten Untersuchungen, wie beispielsweise mit dem ECIS® System, zusätzliche Informationen zur Zellviabilität und Wirkmechanismen erhalten werden können.

Außerdem konnten Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen den beiden *S. chartarum* Stämmen detektiert werden. Die Extrakte aus *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agar zeigten eine stärkere Reduktion der Zellviabilitäten als die Extrakte von *S. chartarum* WT. Die Stammabhängigkeit der Toxizität bei *S. chartarum* ist bereits bekannt (Huttunen et al., 2003). In einer Studie von Kováčiková *et al.* wurden zytotoxische Effekte von vier verschiedenen *S. chartarum* Isolaten untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass alle Stämme zytotoxische Wirkungen hervorriefen, jedoch in einem unterschiedlichen Ausmaß (Kováčiková et al., 2007). Die unterschiedlichen Zytotoxizitäten zwischen den Stämmen können auf eine unterschiedliche Mykotoxinproduktion zurückzuführen sein. Dies konnten Ulrich und Schäfer in ihrer Studie zeigen, in der sie die Konzentration von sechs relevanten Mykotoxinen von vier verschiedenen *S. chartarum* Stämmen auf fünf verschiedenen Wachstumsmedien quantifiziert haben und auch hier Unterschiede in den Mykotoxinkonzentrationen feststellten (Ulrich & Schäfer, 2020). Neben den Unterschieden zwischen den verschiedenen Schimmelpilzspezies und -stämmen wurden ebenfalls Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen den verschiedenen Materialien festgestellt. Bei *S. chartarum* CBS war dies vor allem bei den Extrakten aus bewachsenen Materialoberflächen erkennbar. Hier wiesen die hergestellten Extrakte aus bewachsenen ME-

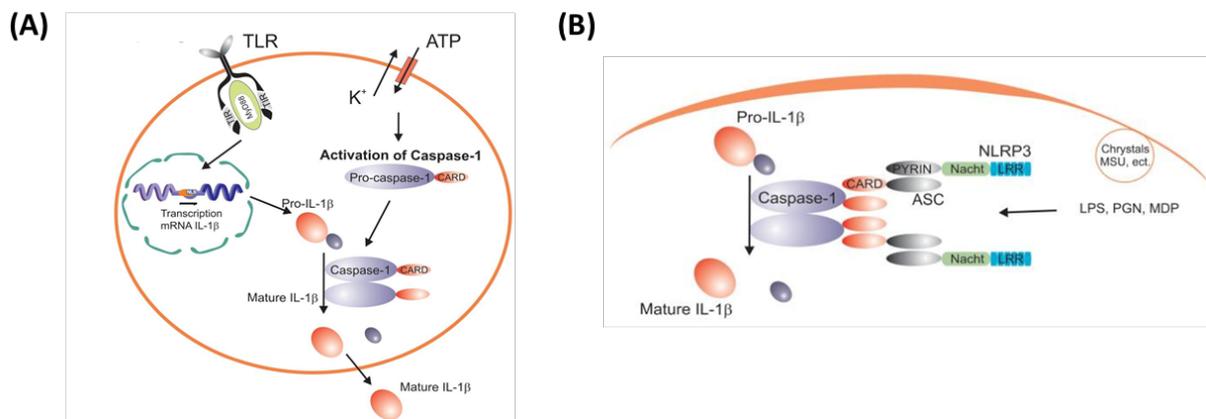
Agar geringere zytotoxische Wirkungen als die Extrakte aus bewachsenen Gipskarton und Raufasertapete auf. Einerseits konnten weniger Sporen vom ME-Agar abgelöst werden, wodurch möglicherweise weniger Mykotoxine vorhanden waren. Andererseits wurde bereits gezeigt, dass die Art und Menge der Mykotoxinproduktion von dem Substrat abhängig ist (Tribelhorn et al., 2023; Ulrich & Schäfer, 2020). Aleksic *et al.* untersuchte die Bildung von vier *S. chartarum* Mykotoxinen auf unterschiedlichen Baumaterialien (Glasfaser, bemalte Glasfasertapete, Tapete, Vinyltapete, Tanne) und zeigte, dass die Mykotoxinbildung auf Tapete deutlich am höchsten war und auf Vinyltapete die Mykotoxinbildung aufgrund fehlenden Pilzwachstums ausblieb (B. Aleksic et al., 2016). *S. chartarum* wächst auf organischen, vor allem Cellulose-haltigen Materialien, wie Gipskarton, Raufasertapete oder Stroh (Došen et al., 2016; Revankar, 2003), weshalb vermutlich auf diesen bewachsenen Materialien mehr Sporen als auf dem *S. chartarum* CBS bewachsenen ME-Agar gebildet wurden. Im Gegensatz dazu konnte von der Oberfläche des *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agars eine höhere Sporenkonzentration als von der Oberfläche des *P. chrysogenum* bewachsenen Gipskartons und Raufasertapete abgelöst werden. Weiterhin konnten in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) erhöhte Proteasekonzentrationen in den Extrakten aus *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar und ME-Agaroberflächen im Vergleich zu den Extrakten aus bewachsenen Gipskarton und Raufasertapete als auch den anderen Schimmelpilzspezies festgestellt werden. Da zytotoxische Wirkungen bei Schimmelpilzen neben Mykotoxinen auch durch freigesetzte Proteasen verursacht werden können, könnte dies eine mögliche Erklärung für die zytotoxischen Effekte der Extrakte aus *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar darstellen. Hierfür sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Zudem wäre an dieser Stelle interessant zu untersuchen, welche Proteasen für die zytotoxischen Wirkungen verantwortlich sind und nach der Extraktionsmethode noch aktiv sind. Die chemische Zusammensetzung von verschiedenen Materialien bzw. Substraten bieten unterschiedliche Nährstoffe und somit unterschiedliche Energiezustände für das Mikroorganismenwachstum, wodurch ebenfalls die Mykotoxinproduktion und möglicherweise die produzierten Proteasen sowie die potentielle Aerosolisierung beeinflusst wird (Al Hallak et al., 2023).

#### 4.1.3 Immunmodulatorisches Potential von Schimmelpilzen

Typ D Trichothecene haben neben zytotoxischen auch immunmodulatorische Wirkungen (Kankkunen et al., 2009). Die Ergebnisse zeigen, dass z.B. das Zytokin GM-CSF nach Exposition bestimmter Extrakte nicht mehr freigesetzt wird oder die Produktion offenbar nicht mehr stattfindet. Ein Grund dafür könnte die Inhibition der Proteinbiosynthese proteinogener Zytokine, wie GM-CSF, in NuLi-1 sein, d.h. in manchen Fällen wird GM-CSF möglicherweise in NuLi-1 Zellen nicht mehr exprimiert, was die verringerte Freisetzung von GM-CSF aus den NuLi-1 Zellen nach der Exposition der Extrakte aus den mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien und Materialoberflächen erklären könnte. In den THP-1 Makrophagen hingegen induzierten die Extrakte aus den mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Materialien und Materialoberflächen eine deutlich erhöhte Freisetzung von IL-1 $\beta$ . Diese Reaktion könnte durch einen anderen Mechanismus, z.B. die Aktivierung der Inflammasom-assoziierten Caspase-1 in den Makrophagen hervorgerufen werden. Makrophagen benötigen für die IL-1 $\beta$  Freisetzung eine doppelte Aktivierung (Abbildung 31A). Einerseits muss die Transkription der mRNA für pro IL-1 $\beta$  über die Bindung der Toll-like Liganden an den entsprechenden Toll-like Rezeptor erfolgen. Andererseits ist die Aktivierung von Proteasen notwendig, um die inaktive Vorstufe pro IL-1 $\beta$  in seine aktive Form proteolytisch zu spalten. Dies könnte in den Makrophagen durch die Aktivierung der Caspase-1, die an einen Proteinkomplex, dem Inflammasom, assoziiert ist, hervorgerufen werden (Abbildung 31B). Das Inflammasom kann durch verschiedene Faktoren und infolgedessen ebenfalls die Caspase-1 aktiviert werden. Darunter zählen bakterielle Faktoren (bakterielle RNA,  $\beta$ -Glucan), endogene (Harnsäurekristalle, ATP) und exogene

Faktoren wie Asbest, Kieselerde und möglicherweise auch Mykotoxine (Netea et al., 2010). Kankkunen *et al.* zeigten, dass durch die Exposition von Satratoxin-positiver *S. chartarum* Sporen als auch Mykotoxine (TypD Trichothecene: Roridin A, Verrucarin A, T2 Toxin) die Caspase-1 in humanen Makrophagen aktiviert wird, die ein Bestandteil des NLRP3-Inflammasoms ist. Sie wiesen nach, dass Satratoxin positive *S. chartarum* Sporen die Genexpression von IL-1 $\beta$  und die Bildung der aktiven Caspase-1 p20 Untereinheit auf Proteinebene induzieren. Die Exposition individueller Mykotoxine (Roridin A, Verrucarin A, T2 Toxin) führte jedoch zu keiner Aktivierung der Synthese des pro IL-1  $\beta$  Proteins, sondern nur in Kostimulation, in diesem Fall mit LPS (Netea et al., 2010).

**Abbildung 31: Aktivierung der Inflammasom-assoziierten Caspase-1 und Freisetzung von IL-1 $\beta$  in Makrophagen**



Doppelte Aktivierung in Makrophagen für die Freisetzung von IL-1 $\beta$  (A), Aktivierung der Caspase-1 durch das NLRP3 Inflammasom (B)

Quelle: (Netea et al., 2010)

Die Produktion und Aktivierung von IL-1 $\beta$  kann auch durch Proteasen, die von Pilzen freigesetzt werden können, erfolgen, wie es Beausejour *et al.* mit *Candida albicans* zeigten (Beauséjour et al., 1998; Netea et al., 2010). Da in den Extrakten aus *P. chrysogenum* bewachsenen ME-Agar und ME-Agaroberflächen möglicherweise erhöhte Proteasekonzentrationen vorliegen, könnten die erhöhten IL-1 $\beta$  Konzentrationen in den THP-1 Makrophagen durch vorhandene fungale Proteasen freigesetzt worden sein. Mit dem wirkungsbasierten Testsystem, welches im Rahmen dieses Projektes entwickelt wurde, konnten sowohl spezies- als auch materialspezifische Unterschiede in der Zytotoxizität und Zytokinfreisetzung nachgewiesen und gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass das Testsystem sensitiv genug ist, um a) toxische Eigenschaften der Proben zu erfassen und b) entsprechende Unterschiede zu registrieren. Da diese Ergebnisse mit bisher veröffentlichten Ergebnissen übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass das Testsystem für die Beurteilung von gesundheitlichen Wirkungen durch Innenraum-relevante Schimmelpilze geeignet ist.

#### 4.1.4 Aerosolisierung von Schimmelpilzbestandteilen

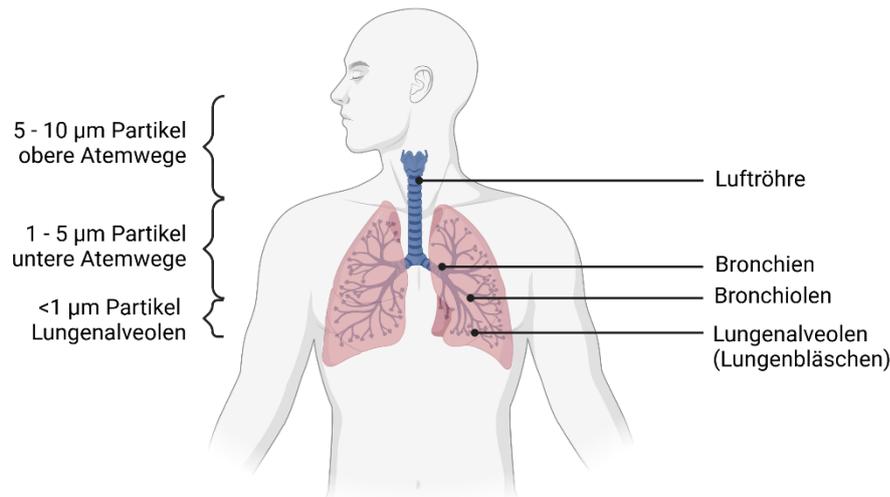
Die Voraussetzung für eine inhalative Exposition mit Schimmelpilzpartikeln im Innenraum ist, dass diese zuvor in die Luft gelangen müssen. Aerosolisierte Schimmelpilzpartikel werden entsprechend ihrer Größe in drei Fraktionen untergliedert: > 2,25  $\mu$ m Sporen, 1,05  $\mu$ m bis 2,25  $\mu$ m Mischung aus Fragmenten und Sporen und < 1,0  $\mu$ m Fragmente im Submikrometerbereich (Reponen et al., 2007). Zu den Fragmenten gehören unter anderem  $\beta$ -Glukane, Allergene und

Mykotoxine (Mensah-Attipoe & Toyinbo, 2019). Zudem können auch Hyphen in die Luft freigesetzt werden, die von 1 µm bis 30 µm groß sein können (Islam et al., 2017). Die Aerosolisierung der Sporen von *Aspergillus* und *Penicillium* erfolgt aufgrund der kleinen Größe von 2 µm bis 3 µm sehr schnell (Al Hallak et al., 2023). Die Sporen von *S. chartarum* hingegen sind segmentiert und von einer Schleimhülle umgeben, weshalb deren Aerosolisierung im feuchten Zustand sehr gering ist. Eine Aerosolisierung der Sporen von *S. chartarum* und des Myzels wird erleichtert, wenn sich die Schleimhüllen beispielsweise durch Trocknung zersetzen (Al Hallak et al., 2023; Došen et al., 2016; Revankar, 2003). In unseren Untersuchungen konnten eindeutige Unterschiede in der freigesetzten Partikelanzahlkonzentration zwischen feuchter und getrockneter *S. chartarum* CBS bewachsener Raufasertapete festgestellt werden. Madsen *et al.* verglich ebenfalls die Aerosolisierung von Sporen zwischen feuchten und getrockneten Schimmelpilz-bewachsenen Gipskarton und zeigte, dass die meisten Sporen vom getrockneten Gipskarton freigesetzt wurden. Die Anwendung der doppelten Luftströmungsgeschwindigkeit konnte jedoch ähnliche Sporenmengen auch vom feuchten Gipskarton erzielen (Madsen et al., 2016). Aleksic *et al.* untersuchte die Aerosolisierung von *A. versicolor*, *P. brevicompactum* und *S. chartarum* bewachsener Raufasertapete. Die Partikelverteilung für die Aerosolisierung von *S. chartarum* bewachsener Tapete ähnelte den dargestellten Partikelverteilungen unserer Studie (Brankica Aleksic et al., 2017). In Aleksic *et al.* wurden zusätzlich die produzierten Mykotoxine der Schimmelpilze identifiziert und quantifiziert. In den hergestellten Extrakten aus aerosolisierter mit *S. chartarum* bewachsener Raufasertapete konnten die Mykotoxine Satratoxin G, Satratoxin H, Roridin L2 sowie Verrucaridin J nachgewiesen werden. Brasel *et al.*, zeigte ebenfalls, dass Mykotoxine nicht nur an Materialien und abgesetzten Staub, sondern auch in Aerosolen, vorkommen können (Brasel et al., 2005). Die Freisetzung der Mykotoxine erfolgt demnach durch die Zerstörung der Sporen bzw. deren Schleimhülle. Sie gelangen dann gebunden an Partikeln in die Luft und können eingeatmet werden (B. Aleksic et al., 2016). Da in dem hergestellten Extrakt aus der aerosolisierten mit *S. chartarum* CBS bewachsenen Raufasertapete ein zytotoxischer Effekt nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass Mykotoxine von der bewachsenen Raufasertapete mit den verwendeten Methoden freigesetzt und extrahiert werden konnten. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit sollten zukünftig weitere mit *S. chartarum* CBS bewachsene Materialien aerosolisiert werden und das zytotoxische und immunmodulatorische Potential der daraus hergestellten Extrakte bestimmt werden.

## 4.2 Risikobewertung der gesundheitlichen Wirkungen bei Schimmelbefall

Mykotoxine stellen aufgrund ihrer toxischen Wirkungen in sehr geringen Konzentrationen ein gesundheitliches Risiko unter anderem für den Menschen bei feuchtbedingtem Innenraumschimmel dar. Da Mykotoxine keine flüchtigen Sekundärmetabolite sind, ist eine Aerosolbildung für die inhalative Aufnahme notwendig. So kann eine inhalative Exposition von Mykotoxinen durch das Einatmen von aerosolisierten Sporen, Fragmenten oder kontaminierten Substrat, an denen sie anheften, erfolgen (Hardin et al., 2003). In Abhängigkeit der Partikelgröße, an denen sich die Mykotoxine befinden, können sie in unterschiedliche Bereiche der Atemwege gelangen und wirken (Abbildung 32). Partikel, die größer als 10 µm sind, können kaum in den Nasen-Rachen-Raum der Atemwege eindringen. Partikel mit einer Größe zwischen 5 µm und 10 µm werden überwiegend in den oberen Atemwegen abgelagert, wobei sich Partikel mit einer Größe zwischen 1 µm und 5 µm in den unteren Atemwegen ablagern. Partikel, die kleiner als 1 µm sind, dringen am tiefsten in die Atemwege, in die Lungenalveolen, ein (Ahmed, 2012; Al Hallak et al., 2023; Nave & Mueller, 2013).

**Abbildung 32: Eindringtiefe in die Atemwege in Abhängigkeit von der Partikelgröße**



Quelle: eigene Darstellung (erstellt mit Biorender.com), Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, adaptiert von (Al Hallak et al., 2023)

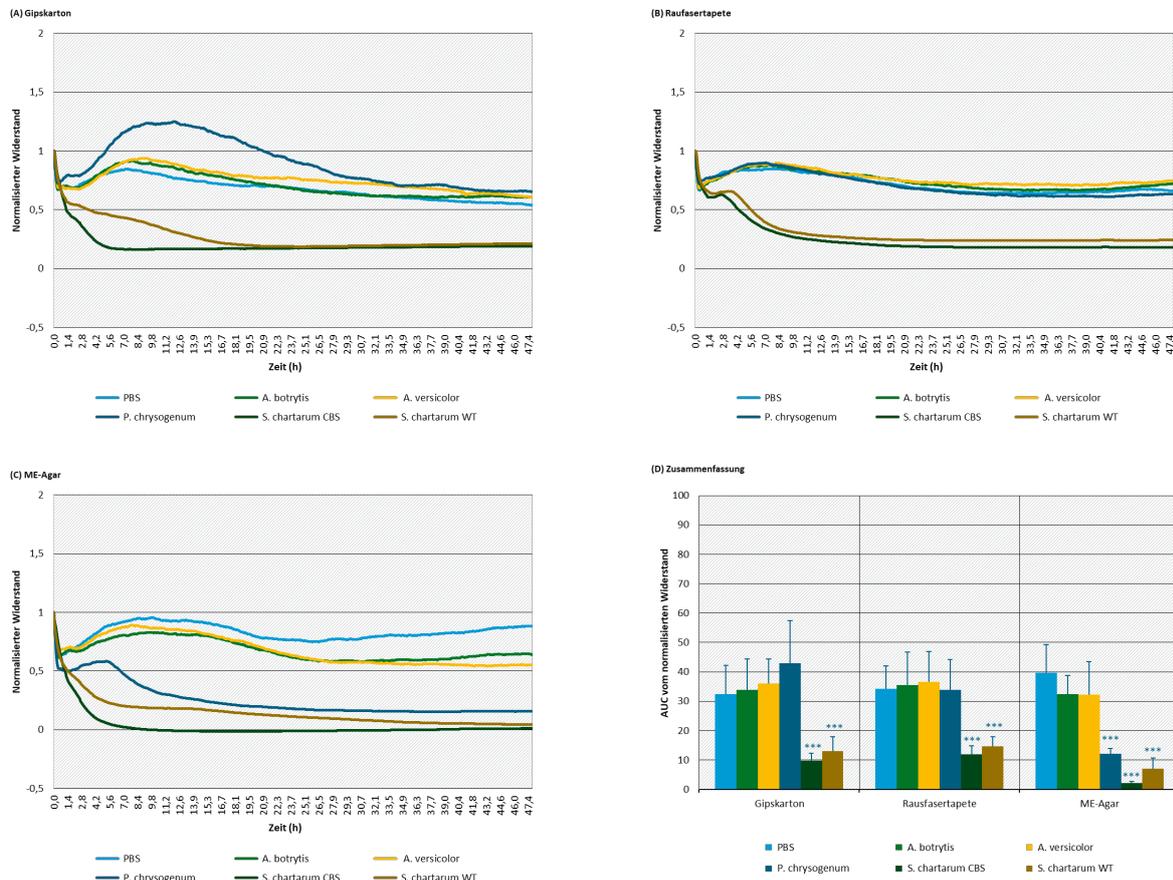
Da die meisten detektierten Partikel bei der Aerosolisierung von *S. chartarum* CBS bewachsener Raufasertapete eine Partikelgröße von kleiner als 4 µm aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass die freigesetzten Partikel in die unteren Atemwege oder sogar in die Alveolen eindringen können. Zudem wird oft in der Literatur beschrieben, dass Typ D Trichothecene vorwiegend an Fragmenten im Submikrometerbereich (<1 µm) vorkommen und vor allem diese Fraktion zur Entwicklung von respiratorischen und allergischen Erkrankungen beitragen, da diese länger als Sporen in der Luft schweben und aufgrund ihrer Größe in die Alveolen eindringen können (Mensah-Attipoe & Toyinbo, 2019; Pei & Gunsch, 2013). Ob die Konzentrationen an Mykotoxinen in schimmelpilzkontaminierten Innenräumen ausreichend sind, um gesundheitsschädigende Wirkungen in den Atemwegen auszulösen, ist nicht bekannt. Aus diesem Grund sollte zukünftig die qualitative und quantitative Bestimmung von toxischen Substanzen, insbesondere der Mykotoxine, als Bestandteil der Risikobewertung mit in das Testsystem integriert werden, um die Exposition toxischer Substanzen quantifizieren zu können und diese mit den Wirkungen korrelieren zu können. Da Schimmelpilze auch mehrere Mykotoxine gleichzeitig produzieren können (Mazur & Kim, 2006), sollten auch die resultierenden kombinatorischen Effekte der Mykotoxine untereinander (B. Aleksic et al., 2016; Ferreira Lopes et al., 2017; Smith et al., 2016) als auch Wechselwirkungen mit anderen Bioaerosolbestandteilen, wie z.B. Endotoxinen, für die Risikobeurteilung mit betrachtet werden. Des Weiteren könnte das entwickelte Testsystem auf dreidimensionaler Ebene, wie ALI-Zellkulturen der Lunge, erweitert werden, um zusätzlich gewebespezifische Eigenschaften, wie die Zilienschlagfrequenz oder die Mukusproduktion zu bestimmen. Beides sind Charakteristika der Lunge, die für die mukoziliäre Abwehr notwendig und in Atemwegserkrankungen, wie Asthma verändert sein können (Boucher, 2019; Fahy & Dickey, 2010; Rubin, 2007). Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde das Testsystem entwickelt, um Reinkulturen von Schimmelpilzen zu untersuchen. In weiterführenden Projekten könnte das Testsystem genutzt werden, um das zytotoxische und immunmodulatorische Potential von Mischkulturen analog wie sie in Innenräumen vorkommen bzw. Extrakte aus realen Bioaerosol- oder Materialproben zu untersuchen. Testsysteme zur Beurteilung der gesundheitlichen Wirkungen durch Schimmelpilze sollten ebenfalls für die Erstellung von Gefährdungsbeurteilungen an

Arbeitsplätzen verwendet werden. Berufsbedingte Tätigkeiten mit Biostoffen, die ebenso Schimmelpilze umfassen, sind in der Biostoffverordnung geregelt. In ihrem Sinne sind Regelungen zum Schutz der Beschäftigten bei solchen Tätigkeiten vor Infektionen sowie sensibilisierenden und toxischen Wirkungen getroffen, die durch Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) umgesetzt werden. In der TRBA 400, der Handlungsanleitung für Gefährdungsbeurteilungen von Arbeitsplätzen, wird aktuell nur die Exposition von Endotoxinen zur Bestimmung des toxischen Potentials herangezogen. Weitere toxische Substanzen, wie Mykotoxine, biologischer Arbeitsstoffe bleiben bislang unberücksichtigt, weshalb ein wirkungsbasiertes Testsystem zwingend notwendig ist. Hierbei sollte neben der inhalativen Exposition auch die dermale Mykotoxinexposition in Betracht gezogen werden, da Mykotoxine aufgrund ihrer Lipophilie eine hohe dermale Absorption besitzen. So wurden bereits Hautveränderungen beim Vorkommen von Schimmelpilzen berichtet (Dill et al., 1997). Daraus resultierende gesundheitliche Auswirkungen mit besonderem Augenmerk auch auf den psychischen Bereich sollten ebenfalls mit integriert werden (Viljoen & Claassen, 2023).

Die in diesem Forschungsprojekt vorliegenden Daten, die auf der *in vitro* Untersuchung von Lungenepithelzellen und Makrophagen basieren, lassen den Schluss zu, dass die in der Innenraumluft zu erwartenden Konzentrationen der hier untersuchten Schimmelpilze *A. botrytis*, *A. versicolor* und *P. chrysogenum* sowohl in materialgebundener als auch luftgetragener Form keine akut toxischen Wirkungen hervorrufen. Eine Ausnahme könnten jedoch spezielle Stämme des Schimmelpilzes *S. chartarum* darstellen, da der hier untersuchte Stamm *S. chartarum* CBS durchweg in allen drei Sammel- und Extraktionsmethoden ein zytotoxisches Potential aufwies und damit höchstwahrscheinlich akut toxische Wirkungen in der menschlichen Lunge hervorrufen kann. Zellkulturexperimente zur Bestimmung von toxischen Potentialen sollten daher zukünftig weiter ausgebaut werden und notwendige Expositions-Wirkungs-Untersuchungen einbezogen werden, um Kausalität zwischen Symptomen von Bewohnern bzw. Arbeitnehmern in Schimmelpilz-belasteten Innenräumen bzw. Arbeitsplätzen weiter aufzuklären. Des Weiteren sollte der Fokus zusätzlich auf *in vitro* Untersuchungen mit wiederholter Exposition der Extrakte liegen, um eine höhere Empfindlichkeit gegenüber sehr niedrigen Konzentrationen und weniger toxischen Mykotoxinen zu erreichen, die auch der Realität näherkommen. Forschungsbedarf besteht ebenso bezüglich möglicher Wechselwirkungen der Mykotoxine untereinander und im Zusammenhang mit Metaboliten anderer Mikroorganismen wie Bakterien.

## A Anhang

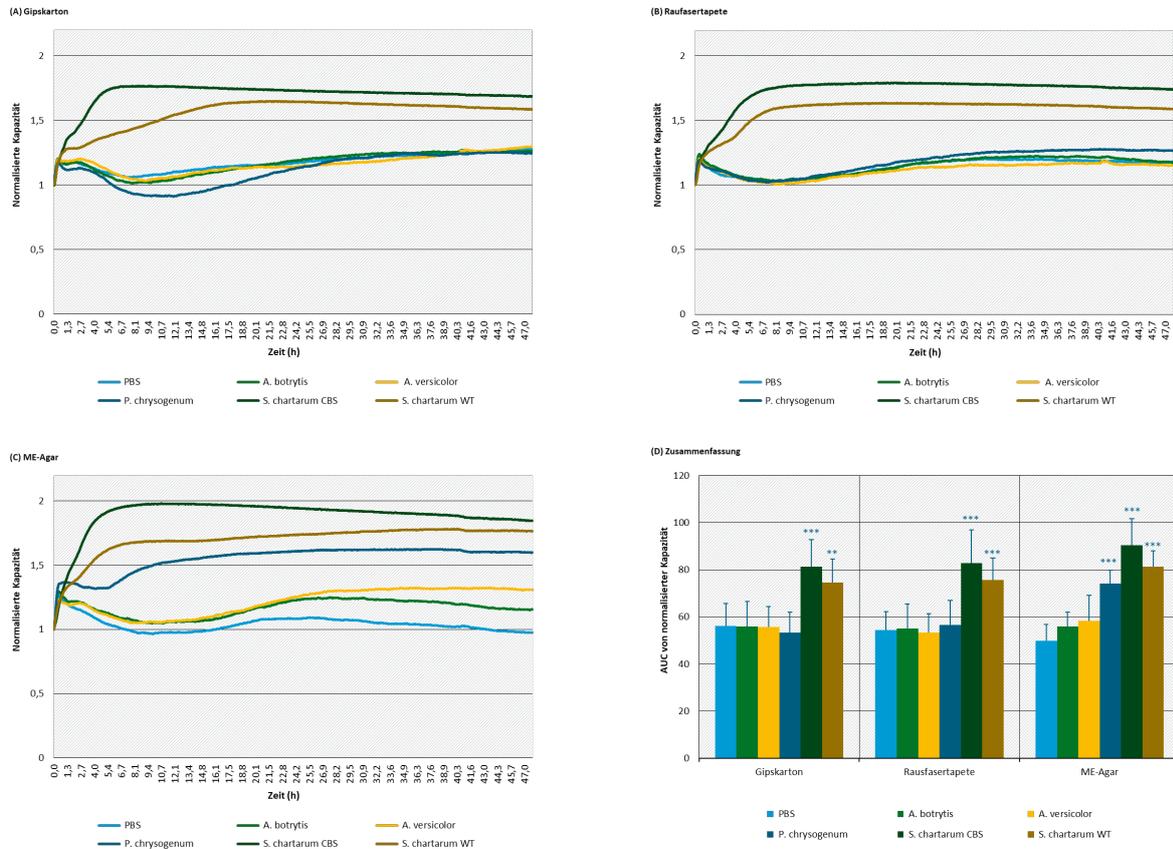
**Abbildung 33: Zeitaufgelöste Widerstandsmessungen von NuLi-1 Zellen nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C), Fläche unter der normalisierten Widerstands-Kurve (D); n=9; Mittelwert (A-C); Mittelwert ± Standardabweichung (D); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

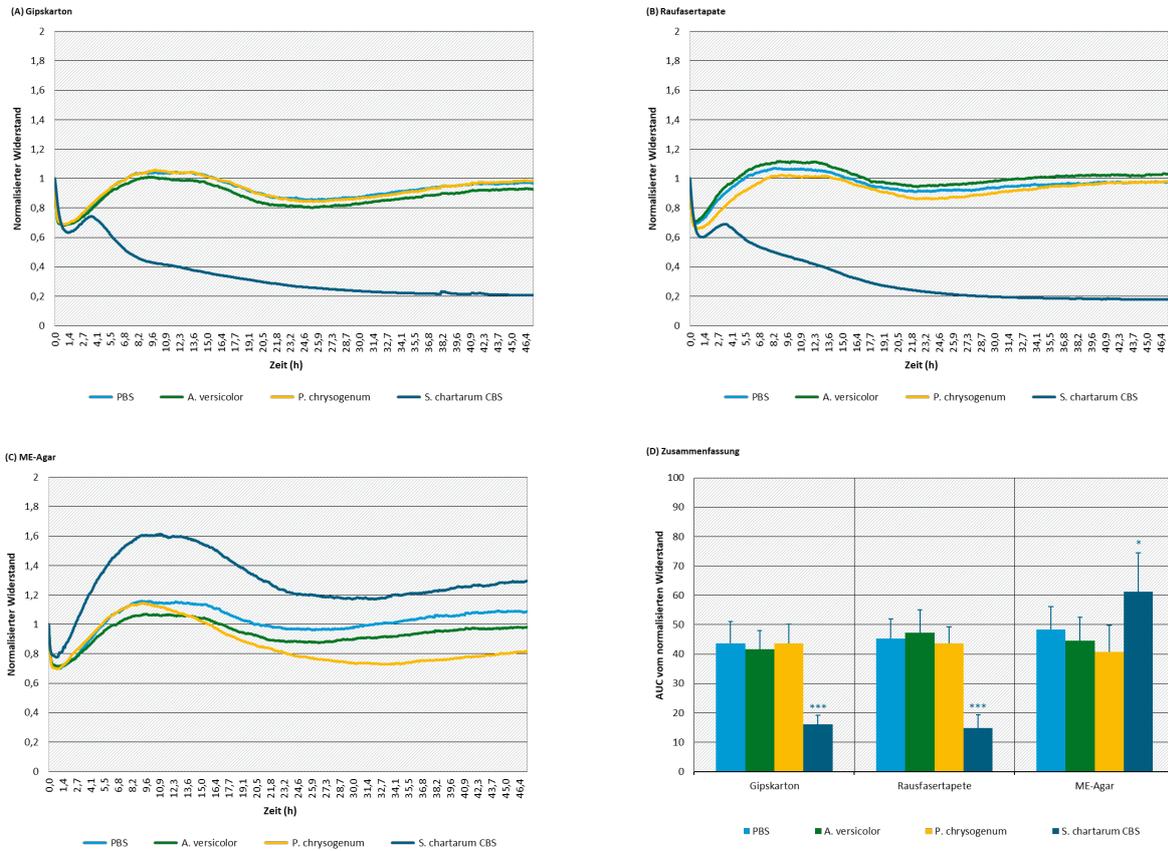
**Abbildung 34: Zeitaufgelöste Kapazitätsmessungen von NuLi-1 nach der Exposition gegenüber Extrakten aus bewachsenen Materialien nach vierwöchiger Wachstumszeit in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C), Fläche unter der normalisierten Kapazitäts-Kurve (D); n=9; Mittelwert (A-C); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (D); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

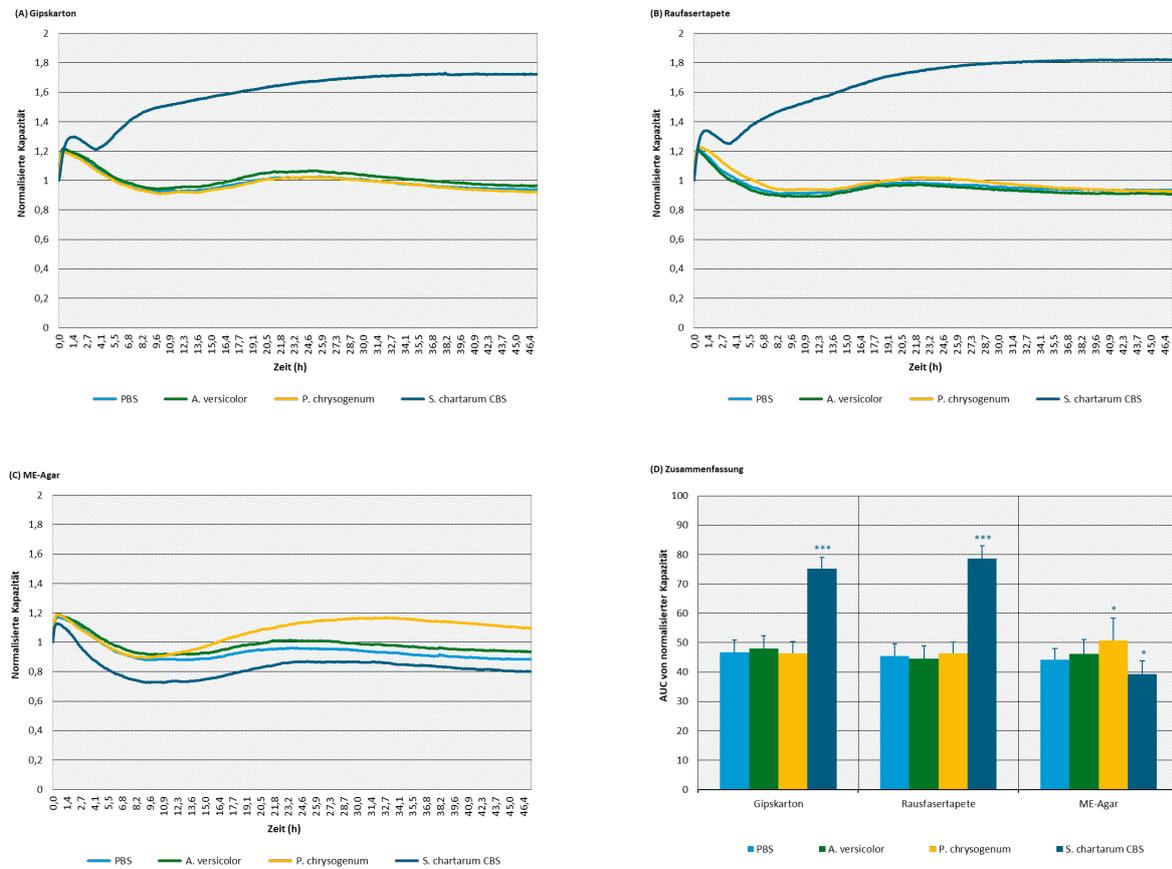
**Abbildung 35: Zeitaufgelöste Widerstandsmessungen von NuLi-1 nach Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



Gipskarton (A), Raufasertapete (B), ME-Agar (C), Fläche unter der normalisierten Widerstands-Kurve (D); n=9; Mittelwert (A-C); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (D); \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

**Abbildung 36: Zeitaufgelöste Kapazitätsmessungen von NuLi-1 nach Exposition gegenüber Extrakten aus Oberflächenabstrichen von den bewachsenen Materialien in Abhängigkeit vom Schimmelpilz**



Gipskarton (A), Rausfaserpapete (B), ME-Agar (C), Fläche unter der normalisierten Kapazitäts-Kurve (D); n=9; Mittelwert (A-C); Mittelwert ± Standardabweichung (D); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Quelle: eigene Darstellung, Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin

## 5 Quellenverzeichnis

- Ahmed, M. M. (2012). Theoretical deposition of fungal aerosol particles in the human respiratory tract. *Journal of Advanced Research*, 3(2), 133–138.  
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2011.06.002>
- Al Hallak, M., Verdier, T., Bertron, A., Roques, C. & Bailly, J.-D. (2023). Fungal Contamination of Building Materials and the Aerosolization of Particles and Toxins in Indoor Air and Their Associated Risks to Health: A Review. *Toxins*, 15(3), Artikel 175.  
<https://doi.org/10.3390/toxins15030175>
- Aleksic, B [B.], Bailly, S [S.], Draghi, M [M.], Pestka, J. J., Oswald, I. P [I. P.], Robine, E [E.], Bailly, J. D. & Lacroix, M. Z. (2016). Production of four macrocyclic trichothecenes by *Stachybotrys chartarum* during its development on different building materials as measured by UPLC-MS/MS. *Building and Environment*, 106, 265–273.  
<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2016.07.002>
- Aleksic, B [Brankica], Draghi, M [Marjorie], Ritoux, S., Bailly, S [Sylviane], Lacroix, M., Oswald, I. P [Isabelle P.], Bailly, J.-D. & Robine, E [Enric] (2017). Aerosolization of Mycotoxins after Growth of Toxinogenic Fungi on Wallpaper. *Applied and environmental microbiology*, 83(16), e01001-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01001-17>
- Antova, T., Pattenden, S., Brunekreef, B., Heinrich, J., Rudnai, P., Forastiere, F., Luttmann-Gibson, H., Grize, L., Katsnelson, B., Moshhammer, H., Nikiforov, B., Slachtova, H., Slotova, K., Zlotkowska, R. & Fletcher, T. (2008). Exposure to indoor mould and children's respiratory health in the PATY study. *Journal of epidemiology and community health*, 62(8), 708–714. <https://doi.org/10.1136/jech.2007.065896>
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Nwozo, S., Odongo, G. A., Eseoghene, I. J., Twinomuhwezi, H., Ogbonna, C. U., Upadhyay, A. K., Adeleye, A. O. & Okpala, C. O. R. (2022). Mycotoxins' Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review. *Toxins*, 14(3), Artikel 167.  
<https://doi.org/10.3390/toxins14030167>
- Beauséjour, A., Grenier, D., Goulet, J. P. & Deslauriers, N. (1998). Proteolytic activation of the interleukin-1beta precursor by *Candida albicans*. *Infection and immunity*, 66(2), 676–681. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.676-681.1998>
- Bennett, J. W. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 497–516.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Boucher, R. C. (2019). Muco-Obstructive Lung Diseases. *The New England journal of medicine*, 380(20), 1941–1953. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1813799>
- Brasel, T. L., Douglas, D. R., Wilson, S. C. & Straus, D. C. (2005). Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Applied and environmental microbiology*, 71(1), 114–122.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.114-122.2005>
- Coulburn, L. & Miller, W. (2022). Prevalence, Risk Factors and Impacts Related to Mould-Affected Housing: An Australian Integrative Review. *International journal of environmental research and public health*, 19(3), Artikel 1854.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph19031854>

- Creasia, D. A., Thurman, J. D., Wannemacher, R. W. & Bunner, D. L. (1990). Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxin in the rat and guinea pig. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology*, 14(1), 54–59. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(90\)90230-h](https://doi.org/10.1016/0272-0590(90)90230-h)
- Da Silva Costa, F. A., Soares, M. R., Malagutti-Ferreira, M. J., Da Silva, G. R., Lívero, F. A. D. R. & Ribeiro-Paes, J. T. (2021). Three-Dimensional Cell Cultures as a Research Platform in Lung Diseases and COVID-19. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 18(5), 735–745. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00348-x>
- Dill, I., Trautmann, C. & Szewzyk, R. (1997). Massenentwicklung von *Stachybotrys chartarum* auf kompostierbaren Pflanztöpfen aus Altpapier. *Mycoses*, 40, 110–114. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1997.tb00552.x>
- Došen, I., Andersen, B., Phippen, C. B. W., Clausen, G. & Nielsen, K. F. (2016). *Stachybotrys* mycotoxins: from culture extracts to dust samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(20), 5513–5526. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9649-y>
- Fahy, J. V. & Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*, 363(23), 2233–2247. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0910061>
- Ferreira Lopes, S., Vacher, G., Ciarlo, E., Savova-Bianchi, D., Roger, T. & Niculita-Hirzel, H. (2017). Primary and Immortalized Human Respiratory Cells Display Different Patterns of Cytotoxicity and Cytokine Release upon Exposure to Deoxynivalenol, Nivalenol and Fusarenon-X. *Toxins*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/toxins9110337>
- Hardin, B. D., Kelman, B. J. & Saxon, A. (2003). Adverse human health effects associated with molds in the indoor environment. *Journal of occupational and environmental medicine*, 45(5), 470–478. <https://doi.org/10.1097/00043764-200305000-00006>
- Holme, J. A., Øya, E., Afanou, A. K. J., Øvrevik, J. & Eduard, W. (2020). Characterization and pro-inflammatory potential of indoor mold particles. *Indoor air*, 30(4), 662–681. <https://doi.org/10.1111/ina.12656>
- Huttunen, K., Hyvärinen, A., Nevalainen, A., Komulainen, H. & Hirvonen, M.-R. (2003). Production of proinflammatory mediators by indoor air bacteria and fungal spores in mouse and human cell lines. *Environmental health perspectives*, 111(1), 85–92. <https://doi.org/10.1289/ehp.5478>
- Islam, M. R., Tudryn, G., Bucinell, R., Schadler, L. & Picu, R. C. (2017). Morphology and mechanics of fungal mycelium. *Scientific reports*, 7(1), Artikel 13070. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13295-2>
- Kankkunen, P., Rintahaka, J., Aalto, A., Leino, M., Majuri, M.-L., Alenius, H., Wolff, H. & Matikainen, S. (2009). Trichothecene mycotoxins activate inflammatory response in human macrophages. *Journal of immunology*, 182(10), 6418–6425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803309>
- Köck, J. M. (2022). *Nachweis von toxinogenen Isolaten von Stachybotrys chartarum mit einem Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) – Assay* [Dissertation]. LMU München, München.
- Kováčiková, Z., Tátrai, E [Erzsébet], Piecková, E [Elena], Tulinská, J [Jana], Pivovarová, Z [Zuzana], Matausic-Pisl, M., Kuricová, M [Miroslava] & Wsolová, L. (2007). An in vitro study of the toxic effects of *Stachybotrys chartarum* metabolites on lung cells. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*, 35(1), 47–52. <https://doi.org/10.1177/026119290703500115>
- Kováčiková, Z., Piecková, E [E.], Tátrai, E [E.], Pivovarová, Z [Z.] & Mataušic-Pišl, M. (2007). Use of the in vitro model for the evaluation of toxic effects of metabolites produced by fungi. In

- C. A. Brebbia (Hrsg.), *Environmental Health Risk IV* (S. 79–84). WIT Press.  
<https://doi.org/10.2495/EHR070091>
- Kováčiková, Z., Tátrai, E [E.], Piecková, E [E.], Kolláriková, Z., Jančinová, V., Tulinská, J [J.], Kuricová, M [M.] & Líšková, A. (2008). In vitro toxicity of indoor fungi from dwellings in Slovakia: testing on the isolated lung cells. In A. Kungolos, C. A. Brebbia & M. Zamorano (Hrsg.), *WIT Transactions on Ecology and the Environment, Environmental Toxicology II* (S. 211–218). WIT PressSouthampton, UK. <https://doi.org/10.2495/ETOX080221>
- Madsen, A. M., Larsen, S. T., Koponen, I. K., Kling, K. I., Barooni, A., Karottki, D. G., Tendal, K. & Wolkoff, P. (2016). Generation and Characterization of Indoor Fungal Aerosols for Inhalation Studies. *Applied and environmental microbiology*, 82(8), 2479–2493.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.04063-15>
- Mazur, L. J. & Kim, J. (2006). Spectrum of noninfectious health effects from molds. *Pediatrics*, 118(6), e1909-26. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-2829>
- Mendell, M. J., Mirer, A. G., Cheung, K., Tong, M. & Douwes, J. (2011). Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environmental health perspectives*, 119(6), 748–756.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.1002410>
- Mensah-Attipoe, J. & Toyinbo, O. (2019). Fungal Growth and Aerosolization from Various Conditions and Materials. In É. Silva de Loreto & J. Simoni Moraes Tondolo (Hrsg.), *Fungal Infection*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81565>
- Movia, D., Bruni-Favier, S. & Prina-Mello, A. (2020). In vitro Alternatives to Acute Inhalation Toxicity Studies in Animal Models-A Perspective. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 549. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00549>
- Nave, R. & Mueller, H. (2013). From inhaler to lung: clinical implications of the formulations of ciclesonide and other inhaled corticosteroids. *International journal of general medicine*, 6, 99–107. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S39134>
- Ndaw, S., Remy, A., Jargot, D., Antoine, G., Denis, F. & Robert, A. (2021). Mycotoxins Exposure of French Grain Elevator Workers: Biomonitoring and Airborne Measurements. *Toxins*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/toxins13060382>
- Netea, M. G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B.-J., van der Meer, J. W. M. & Joosten, L. A. B. (2010). IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS pathogens*, 6(2), e1000661. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000661>
- Øya, E., Becher, R., Ekeren, L., Afanou, A. K. J., Øvrevik, J. & Holme, J. A. (2019). Pro-Inflammatory Responses in Human Bronchial Epithelial Cells Induced by Spores and Hyphal Fragments of Common Damp Indoor Molds. *International journal of environmental research and public health*, 16(6), Artikel 1085. <https://doi.org/10.3390/ijerph16061085>
- Pei, R. & Gunsch, C. K. (2013). Inflammatory cytokine gene expression in THP-1 cells exposed to *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus versicolor*. *Environmental toxicology*, 28(1), 51–60. <https://doi.org/10.1002/tox.20698>
- Piecková, E [E.] & Kolláriková, Z. (2008). In vitro toxicity of indoor moulds from Slovak dwellings. In A. Kungolos, C. A. Brebbia & M. Zamorano (Hrsg.), *WIT Transactions on Ecology and the Environment, Environmental Toxicology II* (S. 227–234). WIT PressSouthampton, UK. <https://doi.org/10.2495/ETOX080241>
- Reponen, T., Seo, S.-C., Grimsley, F., Lee, T., Crawford, C. & Grinshpun, S. A. (2007). Fungal Fragments in Moldy Houses: A Field Study in Homes in New Orleans and Southern Ohio. *Atmospheric environment*, 41(37), 8140–8149.  
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.06.027>

- Revankar, S. G. (2003). Clinical implications of mycotoxins and Stachybotrys. *The American journal of the medical sciences*, 325(5), 262–274. <https://doi.org/10.1097/00000441-200305000-00003>
- Rubin, B. K. (2007). Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatric respiratory reviews*, 8(1), 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2007.02.004>
- Schlosser, O., Robert, S. & Noyon, N. (2020). Airborne mycotoxins in waste recycling and recovery facilities: Occupational exposure and health risk assessment. *Waste management (New York, N.Y.)*, 105, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.02.031>
- Shifrin, V. I. & Anderson, P. (1999). Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 274(20), 13985–13992. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.20.13985>
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E. & Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>
- Tribelhorn, K., Twarużek, M., Kosicki, R., Straubinger, R. K., Ebel, F. & Ulrich, S. (2023). A Chemically Defined Medium That Supports Mycotoxin Production by Stachybotrys chartarum Enabled Analysis of the Impact of Nitrogen and Carbon Sources on the Biosynthesis of Macrocyclic Trichothecenes and Stachybotrylactam. *Applied and environmental microbiology*, 89(7), e0016323. <https://doi.org/10.1128/aem.00163-23>
- Ulrich, S. & Schäfer, C. (2020). Toxin Production by Stachybotrys chartarum Genotype S on Different Culture Media. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 6(3), Artikel 159. <https://doi.org/10.3390/jof6030159>
- Umweltbundesamt (2017). Leitfaden zur Vorbeugung, Erfassung und Sanierung von Schimmelbefall in Gebäuden.
- Viegas, S., Viegas, C. & Oppliger, A. (2018). Occupational Exposure to Mycotoxins: Current Knowledge and Prospects. *Annals of work exposures and health*, 62(8), 923–941. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxy070>
- Viljoen, M. & Claassen, N. (2023). Pathophysiological aspects of exposure to dampness-associated indoor mould and mycotoxins: A mini-overview. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 9, 100228. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100228>
- Walser, S. M., Gerstner, D. G., Brenner, B., Bünger, J., Eikmann, T., Janssen, B., Kolb, S., Kolk, A., Nowak, D., Raulf, M., Sagunski, H., Sedlmaier, N., Suchenwirth, R., Wiesmüller, G., Wollin, K.-M., Tesseraux, I. & Herr, C. E. W. (2015). Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols - A systematic review. *International journal of hygiene and environmental health*, 218(7), 577–589. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.07.004>
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- Zscheppang, K., Berg, J., Hedtrich, S., Verheyen, L., Wagner, D. E., Suttorp, N., Hippenstiel, S. & Hocke, A. C. (2018). Human Pulmonary 3D Models For Translational Research. *Biotechnology journal*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/biot.201700341>