

Klinische Kooperationsgruppe für Umweltdermatologie und Allergologie, GSF-  
Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg / ZAUM-Zentrum  
Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
am Biederstein, Technische Universität München

## Molekularbiologische und zellbiologische Charakterisierung von allergenen Pollen – unter besonderer Berücksichtigung von Umwelteinflüssen

Martina A. Thiel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.rer.nat., Dr.agr.habil.  
Dr.h.c. (Zonguldak University/Türkei) Harun Parlar

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr.med. Heidrun Behrendt  
2. apl.-Prof. Dr.rer.nat., Dr.-Ing.habil. Angelika Görg  
3. Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Alfons Gierl

Die Dissertation wurde am 26.7.2005 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 24.1.2006 angenommen.

**Einige Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind auf nationalen und internationalen Workshops und Kongressen vorgestellt worden:**

Thiel M, C Traidl-Hoffmann, U Risse, C Michel, W Bors, H Behrendt (2003): Antioxidative activity of airborne pollen is species specific. XXII Congress of European Academy of Allergology and Clinical Immunology, EAACI 2003, 7.-11.Juni, Paris, Abstract 1371, p 388

Thiel M, C Traidl-Hoffmann, U Risse, C Michel, W Bors, H Behrendt (2004): Antioxidative activity of airborne pollen is species specific. Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, ADF, Archives of Dermatological Research, Volume 295(8-9), Februar 2004

Thiel M, O Drews, A Köpf, A Görg, H Behrendt, C Traidl-Hoffmann (2004): Proteomics approach for the analysis of allergen carriers. Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, ADF, Februar 2004, Workshop der Arbeitsgruppe „Genomik und Proteomik: Technologien und Analysen“

Thiel M, O Drews, A Köpf, A Görg, H Behrendt, C Traidl-Hoffmann (2004): Proteomics approach for the analysis of allergen carriers. Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie, DGAI, Mainzer Workshop 12.-13.März 2004, Allergo Journal 1/ 2004, Seite 32, V4

Thiel M, O Drews, A Köpf, A. Görg, H Behrendt, C Traidl-Hoffmann (2005): Environmental influence on pollen grains - molecular and cell-function studies. Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, ADF, Februar 2005, Arbeitsgruppe „Genomik und Proteomik: Technologien und Analysen“

Thiel M, O Drews, A Köpf, H Behrendt, A Görg, C Traidl-Hoffmann (2005): Environmental influence on pollen grains - molecular and cell-function studies. Vortrag, 17. Mainzer Allergieworkshop, 11.-12. März 2005, Allergo Journal V1, p 30

Thiel M, C Traidl-Hoffmann, U Risse, C Michel, W Bors, H Behrendt (2005): Proteomic analysis of differentially expressed proteins in urban and rural birch pollen grains. Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, ADF, Archives of Dermatological Research, Volume 296(9), p. 395, März 2005

Thiel M, O Drews, A Köpf, H Behrendt, A Görg, C Traidl-Hoffmann (2005): Environmental influence on pollen grains - molecular and cell-function studies. Allergy Clin Immunol Int: J World Allergy Org, Supplement 1, Abstrakt 1081, p 395

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	ALLGEMEINES ZUR ALLERGIE .....	1
1.2	ALLGEMEINES ZU POLLEN.....	3
1.2.1	<i>Pollen-Entwicklung und Pollenstruktur</i> .....	3
1.2.2	<i>Funktion des Pollens</i> .....	6
1.2.3	<i>Verbreitung allergener Pollen</i> .....	6
1.3	EINFLUSS DER POLLEN AUF DIE MENSCHLICHE GESUNDHEIT .....	8
1.3.1	<i>Pollen als Allergenträger</i> .....	8
1.3.2	<i>Antioxidantien in Pollen</i> .....	12
1.3.3	<i>Proinflammatorische und immunmodulierende Substanzen (PALMs) in Pollen</i> .....	12
1.4	EPIDEMIOLOGISCHE DATEN ZUR ALLERGIEZUNAHME .....	14
1.5	ERKLÄRUNGSMODELLE FÜR DIE ALLERGIEZUNAHME .....	15
1.6	STUDIEN ZUM EINFLUSS VON UMWELTSCHADSTOFFEN AUF DIE ALLERGIEENTWICKLUNG .....	18
1.7	UMWELTRELEVANTE SCHADSTOFFE .....	27
1.8	HINTERGRUND ZU MOLEKULARBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	30
1.9	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>36</b>
2.1	CHEMIKALIEN .....	36
2.2	GERÄTE.....	38
2.3	SONSTIGES .....	40
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>42</b>
3.1	<i>IN VITRO</i> EXPOSITIONEN VON POLLEN IM WIRBELSCHICHTREAKTOR .....	42
3.2	BIRKENPOLLEN-SAMMLUNG .....	46
3.3	STANDORTCHARAKTERISIERUNG DER BIRKEN .....	48
3.3.1	<i>Fragebögen zur Standortcharakterisierung der Birken</i> .....	48
3.3.2	<i>NO<sub>2</sub>-Bestimmung als Indikator für Verkehrsbelastung</i> .....	49
3.3.3	<i>Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU)</i> .....	50
3.4	POLLENEXTRAKT-HERSTELLUNG.....	51
3.5	BESTIMMUNG DER BIOVERFÜGBARKEIT VON POLLENINHALTSSTOFFEN IM EXTRAKT .....	53
3.5.1	<i>Proteinbestimmung</i> .....	53
3.5.2	<i>Bet v 1- Bestimmung mittels ELISA</i> .....	54
3.5.3	<i>Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs)</i> .....	55
3.6	NACHWEIS VON BIOLOGISCHER AKTIVITÄT IM POLLENEXTRAKT .....	57
3.6.1	<i>Bestimmung des antioxidativen Potentials der Pollenextrakte mittels Diphenylpicarylhdyrazyl - Test</i> .....	57
3.6.2	<i>Bestimmung der chemotaktischen Wirkung von Pollenextrakten mittels Migrationsassay</i> .....	57
3.7	NACHWEIS DES ENZYMS LIPOXYGENASE IN POLLEN .....	60

3.7.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	63
3.7.2	<i>Westernblot</i> .....	64
3.7.3	<i>Qualitativer Lipoxygenase Nachweis mittels Antikörper</i> .....	66
3.8	IDENTIFIZIERUNG VON STRESSGENEN IN BIRKENPOLLEN MITTELS <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	
	STRESSGEN-CDNA-MIKROARRAY .....	66
3.8.1	<i>RNA Isolierung aus Birkenpollen</i> .....	67
3.8.2	<i>RT-PCR zur Herstellung von Birkenpollen-cDNA</i> .....	68
3.8.3	<i>Qualitäts-Kontrolle der cDNA mittels Polymerasekettenreaktion</i> .....	69
3.9	2D GELELEKTROPHORESE.....	70
3.9.1	<i>Probenaufbereitung</i> .....	70
3.9.2	<i>Bestimmung der Protein-Quantität</i> .....	71
3.9.3	<i>Rehydrierung von Immobilisierten- pH-Gradienten (IPG)-Streifen</i> .....	71
3.9.4	<i>Markierung der Probe für die Difference Gelelektrophorese (DIGE)</i> .....	72
3.9.5	<i>Proteinfokussierung in der ersten Dimension</i> .....	73
3.9.6	<i>Äquilibration der Immobilisierten-pH-Gradienten (IPG)-Streifen</i> .....	74
3.9.7	<i>Proteinauftrennung in der zweiten Dimension</i> .....	75
3.9.8	<i>Proteinvisualisierung</i> .....	76
3.9.9	<i>Software unterstützte quantitative Auswertung der Gele mittels DeCyder</i> .....	77
3.9.10	<i>Dokumentation der Gele</i> .....	78
3.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	79
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>80</b>
4.1	<i>IN VIVO</i> EXPOSITION VON BIRKENPOLLEN .....	80
4.1.1	<i>Charakterisierung der Umweltbelastung an den Birken-Standorten</i> .....	80
4.1.1.1	Erhebungsbögen zu den Birken und deren Standorte.....	81
4.1.1.2	NO <sub>2</sub> -Bestimmung an den Standorten .....	82
4.1.1.3	Umwelt-Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz .....	84
4.1.1.4	Vergleich der Umweltbelastung an den Birken-Standorten .....	85
4.1.2	<i>Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe von in vivo exponierten Birkenpollen</i> .....	86
4.1.2.1	Unterschiede der Bioverfügbarkeit zwischen den Pollen-Sammeljahren.....	88
4.1.2.2	Vergleich der Polleninhaltsstoffe zwischen „Land“- und „Stadt“-Pollen .....	89
4.1.2.3	Einfluss der Umweltparameter auf die Bioverfügbarkeit von Polleninhaltsstoffen .....	92
4.1.3	<i>Nachweis biologischer Aktivität im Pollenextrakt der in vivo exponierten Pollen</i> .....	94
4.1.3.1	Wechselwirkung von neutrophilen Granulozyten mit Birkenpollenextrakten als Chemoattraktanz im Migrationsassay .....	94
4.1.3.2	Korrelationen der Pollen-assoziierten Lipidmediatoren mit dem Migrationsindex .....	98
4.1.3.3	Unterschiede zwischen den Landbirken- und den Stadtbirken- Pollenextrakten in Bezug auf ihr Potential neutrophile Granulozyten zu aktivieren.....	99
4.2	<i>IN VITRO</i> EXPOSITIONEN VON BIRKEN- UND GRASPOLLEN .....	102
4.2.1	<i>Funktionsüberprüfung der Expositionsanlage</i> .....	102
4.2.2	<i>Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe von in vitro exponierten Pollen</i> .....	107

4.2.3	<i>Einfluss anthropogener Stoffen (SO<sub>2</sub>, Partikel, VOC) auf die Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe</i> .....	108
4.2.4	<i>Artunterschiede bei der Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe</i> .....	114
4.2.5	<i>Nachweis von biologischer Aktivität im Pollenextrakt von in vitro exponierten Pollen</i> ...	117
4.2.5.1	Einfluss der Pollenextrakte von <i>in vitro</i> exponierten Pollen auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay .....	117
4.2.5.1.1	Einfluss der Schadstoff-exponierten Pollen auf den Migrationsindex im Vergleich zu den mit synthetischer Luft exponierten Pollen .....	120
4.2.5.1.2	Korrelation der gemessenen Pollen-assozierten Lipidmediatoren im Pollenextrakt mit den standardisierten Migrationsindizes .....	120
4.2.5.1.3	Vergleich der standardisierten Migrationsindizes zwischen <i>Betula</i> - und <i>Phleum</i> -Pollenextrakten .....	121
4.2.5.2	Antioxidatives Potential von Pollenextrakten .....	123
4.2.5.2.1	Vergleich des antioxidativen Potentials der <i>in vitro</i> exponierten Pollen .....	124
4.2.5.2.2	Artspezifische Unterschiede im antioxidativen Potential von Pollenextrakten .....	125
4.3	NACHWEIS VON LIPOXYGENASE IN POLLEN .....	126
4.3.1	<i>Optimierung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot</i> .....	127
4.3.2	<i>Optimierung des Antikörpernachweises</i> .....	127
4.4	IDENTIFIZIERUNG VON STRESSGENEN IN BIRKENPOLLEN MITTELS CDNA MIKROARRAY-TECHNOLOGIE .....	129
4.4.1	<i>RNA-Isolierung aus Birkenpollen</i> .....	130
4.4.2	<i>Reverse Transkription (RT-PCR) zur Herstellung von Birken cDNA</i> .....	130
4.4.3	<i>Qualitätskontrolle der cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	131
4.4.4	<i>Mikroarray mit Pollen-RNA</i> .....	132
4.5	KOMPARATIVE PROTEOMSTUDIE VON LAND- UND STADT-BIRKENPOLLEN MITTELS 2D ELEKTROPHORESE .....	134
4.5.1	<i>Optimierung der Probenaufbereitung und der 2D elektrophoretischen Trennungsbedingungen für Birkenpollen-Extrakte</i> .....	134
4.5.2	<i>Quantitative Analyse der Proteinexpression mittels Difference Gelelektrophorese</i> .....	137
4.5.3	<i>Computerunterstützte-statistische Auswertung der Expressions-Level der Proteine</i> .....	138
4.5.4	<i>Sequenzierung der Spots</i> .....	144
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>146</b>
5.1	CHARAKTERISIERUNG VON POLLEN AUF RNA-EBENE .....	146
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER POLLEN AUF PROTEOM-EBENE .....	147
5.3	EINFLUSS VON UMWELTFAKTOREN AUF DIE BIOVERFÜGBARKEIT VON POLLENINHALTSSTOFFEN .....	149
5.3.1	<i>Einfluss der Extraktionsmethode auf die Bioverfügbarkeit von Polleninhaltsstoffen</i> .....	150
5.3.2	<i>In vitro Expositionen - Einfluss von Luftschadstoffen auf Pollen</i> .....	152
5.3.3	<i>In vivo Expositionen - Einfluss von Umweltbedingungen auf Pollen</i> .....	156

5.3.4	<i>Ist der Einfluss von Umweltschadstoffen artspezifisch ?</i> .....	158
5.4	ROLLE VON LIPOXYGENASEN UND 14-3-3 PROTEIN IN POLLEN .....	160
5.5	EINFLUSS DER POLLEN AUF DIE MENSCHLICHE GESUNDHEIT .....	161
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>168</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>I</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
DTT	Dithiothreitol
ESI-MS	Elektrospray-Massenspektrometer
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie
h	Stunde
HODE	Hydroxyoktadiensäure
HOTE	Hydroxyoktatriensäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
LfU	Landesamt für Umweltschutz
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations- Massenspektrometrie
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PALM <sub>LTB4</sub>	Leukotrien-ähnliche Substanzen
PALM <sub>PGE2</sub>	Prostaglandin-ähnliche Substanzen
PALMs	Pollen-assoziierte Lipidmediatoren
pI	Isoelektrischer Punkt
rF	relative Luftfeuchte
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviaton
SDS	Natriumdodecylsufat

sec	Sekunde
TEMED	N´N´N´N-Tetramethyldiamin
TOF	Flugzeit (time of flight)
VOC	Flüchtige organische Substanzen

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines zur Allergie

Die Allergief Formen, die heutzutage als Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen), Urtikaria (Nesselsucht), Neurodermitis (atopisches Ekzem) und bronchiales Asthma geführt werden, sind schon über viele Jahrzehnte bekannt (Jackson 2001). Heuschnupfen wurde bereits 1819 von John Bostock als eine außergewöhnliche Reaktion auf äußere Stimuli beschrieben, die er damals als „Catarrhus aestivus“ bezeichnete (Bostock 1819). Im Jahre 1873 gelang es Charles Blackley durch Selbstversuche Pollen als Auslöser dieser Krankheiten zu identifizieren (Blackley 1873). Den Term der „Allergie“ führte der Kinderarzt Clemens von Pirquet im Jahre 1906 ein (von Pirquet 1906). Coca und Cooke schlugen 1923, nachdem deutlich war, dass Asthma und Heuschnupfen ähnliche pathologische Formen aufwiesen, den Term „Atopie“ vor (Coca und Cooke 1923). Heute definiert man die Allergie als eine verstärkte spezifische Abwehrreaktion gegenüber an sich harmlosen Substanzen im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit (Ring 2004).

Bis jetzt sind die Determinanten eines Nicht-Allergikers und eines Allergikers nicht vollständig aufgeklärt. Sicher ist, dass sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren bei dieser, in den letzten Jahrzehnten immer häufiger auftretenden Krankheit, eine Rolle spielen (Ring 2004, Taylor 1984, Wüthrich 1989). Darüber hinaus ist die allergische Reaktion abhängig von der Pollenart, der Allergenkonzentration, der Kontaktmethode, sowie vorausgegangener Allergen-Exposition des Patienten (Ring 2003). Vor der Entstehung einer Allergie kommt es zu einem Erstkontakt des Allergenträgers mit der Bindehaut der Augen, der Schleimhaut der Nase und der Bronchien. In dem wässrigen Milieu der Schleimhaut werden Proteine, unter anderem jene mit allergischem Potential, gelöst und von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) als körperfremd erkannt. Die aufgenommenen Proteine/Allergene werden prozessiert und in den regionären Lymphknoten naiven T-Helfer-Zellen ( $T_H$ -Zellen) präsentiert. Anders als bei der erwünschten Immunantwort des Körpers gegen Bakterien und Viren, bildet sich hierbei jedoch bei empfindlichen Individuen kein Schutz gegenüber dem Allergen aus. Stattdessen kommt es zu einer Sensibilisierung. Die Sensibilisierungsphase

läuft symptomlos ab. Erst nach der stattgefundenen Sensibilisierung kommt es bei erneutem Kontakt mit dem Allergen zur allergischen Entzündungsreaktion.

Nach Coombs und Gell (1963) werden Allergien in vier Reaktionstypen eingeteilt. Die am häufigsten auftretende Überempfindlichkeitsreaktion ist die Allergie vom Soforttyp, auch Typ I Allergie genannt. Diese Allergieform tritt nach der Sensibilisierung z.B. gegen Blütenpollen, Tierhaut, Tierhaare, Hausstaub oder Insektengifte auf. Die Krankheits-Symptome erfolgen unmittelbar nach erneutem Allergenkontakt. Charakteristisch bei diesem Allergie-Typ ist, dass es zu einer übermäßigen Produktion des allergenspezifischen Immunglobulins E (IgE) und zu einer nachfolgenden Histaminausschüttung kommt. Das Histamin wird dabei aus Mastzellen ausgeschüttet. Mindestens zwei spezifische IgEs, die an den hochaffinen IgE Rezeptor ( $Fc_\epsilon RI$ ) der Mastzellen oder basophilen Granulozyten gebunden sind, werden mit dem Allergen quervernetzt. Der entstandene Allergen-Antikörper-Komplex löst eine Signalkaskade aus, die im Ergebnis zur Freisetzung von Mediatoren wie z.B. Histamin führt. Diese Mediatoren, insbesondere Histamin, bewirken im umliegenden Gewebe eine allergische Entzündungsreaktion mit klinischen Symptomen wie Asthma bronchiale und Rhinokonjunktivitis. Aber auch der Magen-Darm-Trakt kann im Falle von Lebensmittelallergien betroffen sein. Bei hochgradigen anaphylaktischen Reaktionen kann es im schlimmsten Fall zu generalisierten Reaktionen mit anaphylaktischem Schock kommen, der auch zum Tod führen kann.

Auf zellulärer Ebene geht diesen Reaktionen eine Deregulation der  $T_{H1}$  /  $T_{H2}$  - Immunantwort voraus, wobei bei einer allergischen Reaktion die  $T_{H2}$ -Immunantwort überwiegt. Das Allergen wird den  $T_H$ -Zellen präsentiert, die daraufhin Zytokine ausschütten und B-Lymphozyten aktivieren. Bei der allergischen Reaktion vom Soforttyp ist hauptsächlich die Immunantwort durch  $T_{H2}$ -Zellen von Bedeutung, die vermehrt Interleukin 4 (IL-4) produzieren. Dies hat zur Folge, dass die aktivierten B-Zellen zu einer Immunglobulin E (IgE) produzierenden Plasmazelle differenzieren.

Die weiteren Reaktionstypen werden im Folgenden nur kurz erläutert. Für detailliertere Mechanismen der verschiedenen Allergietypen wird auf die gängige immunologische und allergologische Literatur verwiesen (Roitt et al. 1985, Janeway et al. 2002). Bei dem Typ II hingegen richten sich die Antikörper (IgG) gegen Antigene, die auf körpereigenen Zellen sitzen. Auf diese Weise werden die

eigenen Zellen zum Ziel von Immunreaktionen und es kommt zu zytotoxischen Reaktionen von Killerzellen oder zu komplementvermittelter Lyse (Roitt et al. 1995). Dieser Typ tritt z.B. bei Transfusionszwischenfällen durch die Reaktion von natürlichen Antikörpern gegen Fremd-Antikörper auf.

Die Typ III Reaktion ist gegen lösliche Antigene gerichtet. Es bilden sich Immunkomplexe, dies führt zur lokalen Schädigung des betroffenen Gewebes. Die Serumkrankheit wird über diesen Typ vermittelt.

Die vierte Allergieform, die verzögerte Typ IV Reaktion, wird über T-Zellen vermittelt. Die Gewebsschädigung kann auf der Aktivierung von Makrophagen durch  $T_{H1}$ -Zellen beruhen, es kommt zu Entzündungsreaktionen. Als klassische Beispiele gelten hier die Tuberkulinreaktion und das allergische Kontaktekzem.

## 1.2 Allgemeines zu Pollen

### 1.2.1 Pollen-Entwicklung und Pollenstruktur

Das Pollenkorn entwickelt sich aus der Mikrospore, die in den Staubbeuteln, den Antheren von Pflanzen, gebildet wird (Abbildung 1.2.1). Die Antheren enthalten Archesporencellen, die unter Bildung der parietalen Zellschicht und dem sporogenen Gewebe differenzieren. Die parietalen Zellen bilden die Außenwand der Anthere, sowie eine Innenschicht, das Tapetum. Das Tapetum liefert die Substrate für die Pollenentwicklung. Aus dem sporangen Gewebe entwickelt sich die sogenannte Pollenmutterzelle. Durch Meiose entwickeln sich aus der Pollenmutterzelle vier Mikrosporen, die Tetrade. Nach mitotischer Teilung geht aus der Mikrospore eine generative und eine vegetative Zelle hervor (Abbildung 1.2.1), (Stanley 1985). Bei manchen Arten werden auch zwei generative Zellen gebildet (McCormick 1993). Bei der Entwicklung der Angiospermenpollen teilt sich der Kern der generativen Zelle ein zweites Mal, wobei zwei Spermazellen gebildet werden (McCormick 2004). Bei den Gymnospermen hingegen kommt es bei der Teilung der generativen Zelle zu einer sterilen Zelle und zu einer spermatogenen Zelle (Stanley 1985). Das reife Pollenkorn wird als männlicher Gametophyt bezeichnet. Bei der Reifung des Pollens scheinen Trienfettsäuren eine entscheidende Rolle zu spielen (McConn et al. 1996).

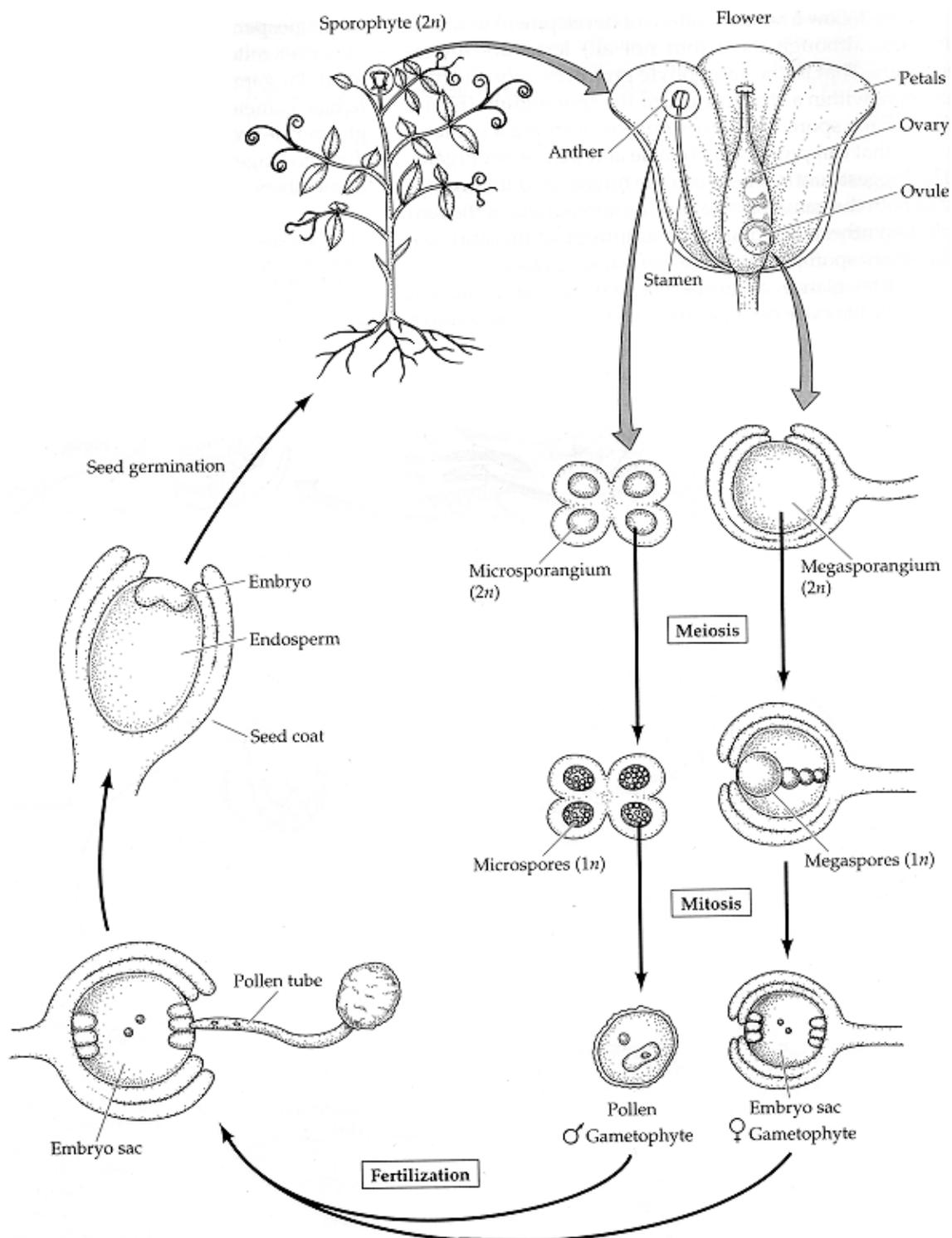


Abbildung 1.2.1: Lebenszyklus eines Angiosperms. Der Sporophyt bildet den männlichen und weiblichen Gametophyten aus. Durch Meiose entwickeln sich aus den Zellen des Microsporangiums (im Anther) Mikrosporen. Nach mitotischer Teilung geht aus einer Mikrospore eine generative und eine vegetative Zelle hervor (Pollen). Befruchtung findet statt, wenn das Pollenkorn den Pollenschlauch ausbildet und Richtung Embryosack wächst. Der Lebenszyklus kann von vorne beginnen (Gilbert et al. 1997).

Der Pollen ist von einer doppelwandigen Struktur umgeben (Abbildung 1.2.2). Die innere Schicht wird als Intine bezeichnet und besteht aus Pektocellulose. Die äußere Schicht ist die sogenannte Exine (Abbildung 1.2.2). Das Sporopollenin in der Exine, eine äußerst widerstandsfähige Substanz, ist für Pollen charakteristisch (Bedinger 1992). Die Zusammensetzung der Polleninhaltsstoffe ist abhängig von der jeweiligen Spezies. Das Trockengewicht der Pollen besteht aus ca. 2,6-12,4% Stärke. Generell enthalten Pollen ca. 1-4% Lipide, 13-37% Kohlenhydrate, 11-20% Proteine und 1-2% organische Komponenten. Der Hauptanteil des Pollens ist Wasser (Iwanami 1988). Die Farbe des Pollens, die einen Bereich von weiß bis blau und gelb-orange abdeckt, wird hauptsächlich durch Flavonoide und Karotinoide bestimmt. Wie andere Zellen auch besitzen Pollen einen Nukleus, einen Golgi-Apparat, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Pollen besitzen keine Chloroplasten und sind von der Versorgung der Mutterpflanze und nach Entlassen durch diese, durch Nährstoffe von Außen abhängig.

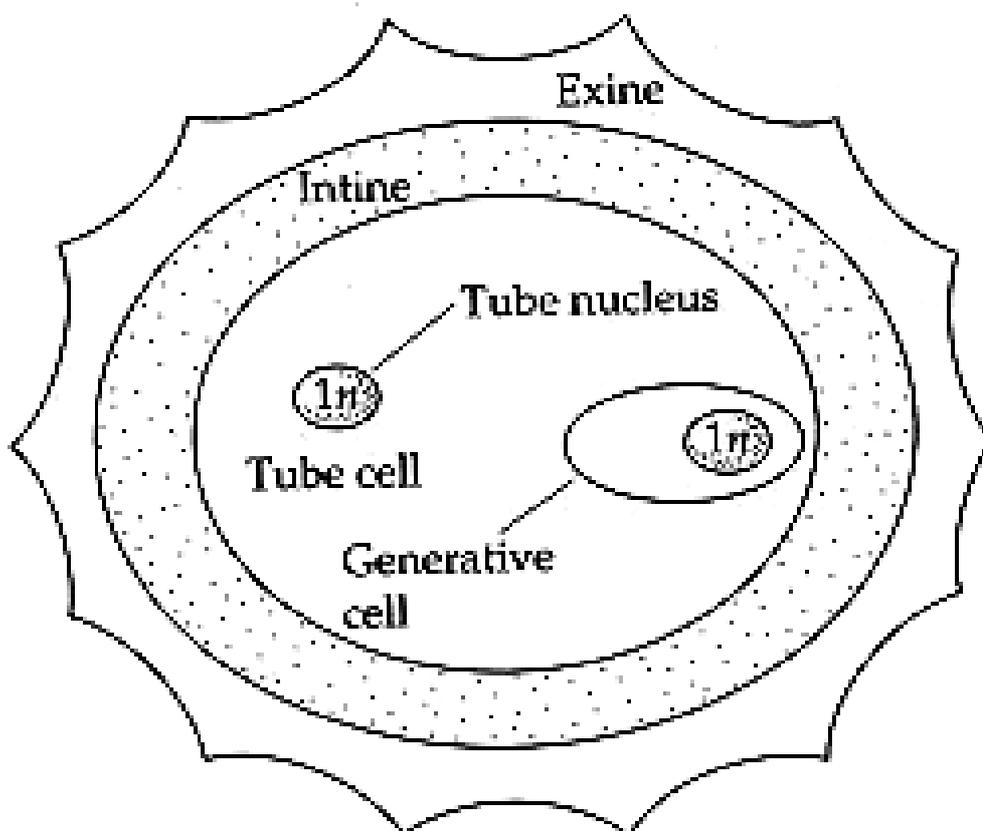


Abbildung 1.2.2: Pollenstruktur - bestehend aus Pollenwand, der Exine (äußere Schicht), Intine (innere Schicht). Im Polleninneren befindet sich der Nukleus, die generative Zelle, die zwei Spermazellen ausbildet (Gilbert et al. 1997).

### 1.2.2 Funktion des Pollens

Der Pollen wird von Samenpflanzen zur geschlechtlichen Fortpflanzung gebildet. Die Funktion des Pollenkorns besteht im Transport des männlichen Erbgutes zum Ovarium (Abbildung 1.2.1), (Solomon 2002). Es kann nur mit Pollen, die auf einer Pflanze derselben Art landen, eine Befruchtung stattfinden. Dies ist ein komplexer Vorgang, der vermutlich sowohl von Proteinen als auch von Lipiden gesteuert wird (Traidl-Hoffmann et al. 2003). Mehrere Studien vermuten, dass die Proteine, die zur Erkennung der eigenen Art verantwortlich sind, die potentiellen Allergene sind (Murfett et al. 1996, Knox und Suphioglu 1996). Diese Proteine sind hauptsächlich in der Pollenwand lokalisiert und können sehr schnell in wässrigem Milieu freigesetzt werden (Emberlin 1995). Trifft das Pollenkorn auf die Narbe eines entsprechenden Angiospermen, bildet sich ein Pollenschlauch zur Übertragung des männlichen Erbgutes aus. Beim Landen des Pollenkornes auf das Stigma werden Wasser, Zucker und Aminosäuren aufgenommen und das Pollenkorn schwillt hierdurch an. Das Zeitfenster in dem eine Pollen-Stigma-Interaktion stattfinden muss, um die Übertragung des Erbmateriails zu gewährleisten, ist von Art zu Art verschieden. Die Ausbildung des Pollenschlauches erfolgt in der Regel innerhalb von 2-40 Minuten und kann eine enorme Länge, bis zu hundertmal länger als das Pollenkorn, erreichen (Iwanami 1988). Zum Beispiel ist die Pollenschlauch-Wachstumsrate bei *Lilium longiflorum* 5-25  $\mu\text{m}/\text{min}$ , die zwar mit der Zeit abnimmt, aber bis zu 48 Stunden anhalten kann (Parton et al. 2001). Maispollenschläuche wachsen sogar bis zu 160  $\mu\text{m}$  in der Stunde (Mascarenhas 1993). Es wird vermutet, dass vor allem Lipide für die Navigation des Pollenschlauches zum Ovarium von Bedeutung sind (Wolters-Arts et al. 1998, Fiebig et al. 2000, Lush et al. 1998). Aber auch bei der Erkennung des arteigenen Stigmas sind Lipide beteiligt (Rodriguez-Garcia et al. 2003, Pruitt et al. 2000, Preuss et al. 1993, Piffanelli et al. 1998).

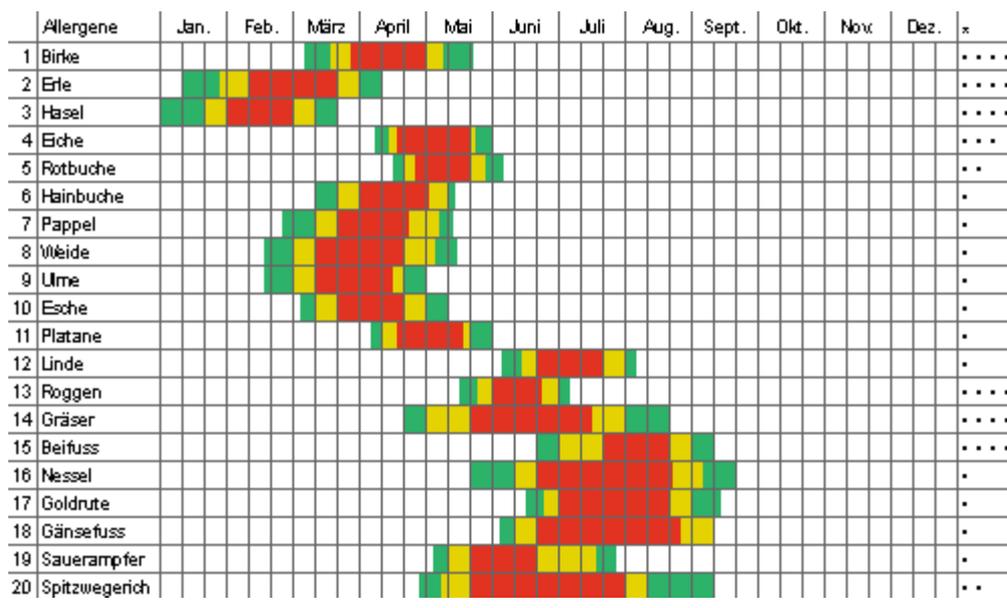
### 1.2.3 Verbreitung allergener Pollen

Anemophile Pflanzenarten nutzen den Wind als Transportmittel für ihre Pollen aus. Die anemophilen Pollen sind leicht und klein (10-80  $\mu\text{m}$ ) und können in 5000 m Höhe über kilometerlange Strecken (Stanley 1985) übertragen werden. Um eine ausreichende Übertragung der Pollen auf die weibliche Blütennarbe zu

gewährleisten, werden ungeheure Mengen an Pollen produziert. Birken z.B. bilden in 100 Kätzchen  $12 \text{ cm}^2$  Pollen (Stanley 1985) und ein Baum setzt in fünf Jahren mehrere Kilogramm Pollen frei.

Gerade die anemophilen Arten spielen für die Allergiker eine bedeutende Rolle, da Bäume, Gräser und Kräuter den Hauptanteil der exogenen Allergenquellen darstellen. Jede Pflanzenart blüht zu speziellen Zeitpunkten. Pollenflugkalender, wie in Abbildung 1.2.3 dargestellt, geben Allergikern Hinweise darauf, wann mit welchen Pollen und deren Allergenen zu rechnen ist. Generell blühen Bäume vor den Gräsern und danach die Kräuter. In ländlichen Regionen ist die Belastung mit Pollen am Morgen, zur Pollenemissionszeit, und am Abend am höchsten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich abends die Luft abkühlt und die Pollen aus den höheren Luftschichten sedimentieren (Behrendt et al. 1991, Kainka-Stänicke et al. 1989). In der Stadt dagegen bleibt die Luft länger erwärmt, so dass sich die Pollensedimentationsspitze zeitlich nach hinten verschiebt. Der Blühzeitpunkt hängt zusätzlich von klimatischen Bedingungen ab. So blühen die Birken z. B. im Norden von Deutschland eher als im Süden. Die allgemeine Klimaerwärmung führt bei manchen Arten zu einer Veränderung der Blühdauer (Emberlin et al. 2002, Menzel 2000). So blühen die Bäume heutzutage immer früher. Aber auch das Pollensaisonende hat sich nach hinten verschoben. Die Pollenflugperiode hat sich generell verlängert (Emberlin et al. 1993)

### Pollenflugkalender



■ starke Belastung   
 ■ mäßige Belastung   
 ■ sporadische Belastung  
 Im Bergland über 600 m muss mit Verspätung der Pollenfreisetzung gerechnet werden.

\* Klinische/ Therapeutische Relevanz

Abbildung 1.2.3: Pollenflugkalender (Quelle: <http://www.allergiecheck.de/sites/aktuelles/allergenkalender.htm>)

## 1.3 Einfluss der Pollen auf die menschliche Gesundheit

### 1.3.1 Pollen als Allergenträger

Einige Pollenarten sind durch ihre Allergene in der Lage bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auszulösen. Bei der Hälfte aller Allergiker ist die Exposition mit allergenen Pollen für ihre gesundheitlichen Probleme verantwortlich (Ring 2004). Die allergische Symptomatik ist saisonal begrenzt, wobei der Schweregrad mit den Pollenflugzahlen korreliert (Behbehani et al. 2004, Roberts et al. 2004). Die Konzentration von Pollen ist zudem nicht nur korreliert mit allergischen Symptomen, sondern Brunekreef et al. (2000) konnten zeigen, dass ein Zusammenhang mit kardiovaskulären und respiratorisch bedingten Mortalitäten besteht.

Bei der allergischen Symptomatik handelt es sich um Pollinosis, auch als Heuschnupfen oder Heufieber bekannt. Die klinischen Symptome sind Jucken von Augen und Hals, eine starke Sekretion der Schleimhäute, Niesattacken und Atemnot. Die meisten Pollen, die mit einer Pollinosis – Heuschnupfen – assoziiert

sind, werden von anemophilen Angiospermen gebildet. In Nordeuropa zählen Birkenpollen zu den häufigsten Auslösern einer Allergie. In Mitteleuropa spielen Gräserpollen von Lieschgras, Knäuelgras, Wiesenrispengras, Glatthafer, Wiesenschwingel und Wiesenfuchsschwanz die bedeutendste Rolle (Ring 2004). Bei den Kräutern sind in Europa hauptsächlich die Beifußpollen von Bedeutung (Sachverständigenrat für Umweltfragen 1999). Die in dieser Studie untersuchten Birkenpollen (*Betula verrucosa*) und Wiesenlieschgraspollen (*Phleum pratense*) sind besonders relevant, da sie als hochallergen gelten. In Deutschland liegen mit 58% auf Lieschgras und 47% auf Birkenpollen die Sensibilisierungsraten am höchsten (Hermann-Kunz und Thierfelder 2002). Allgemein liegt die Prävalenz für allergische Rhinokonjunktivitis bei 13-14 Jährigen in Deutschland bei 13% und befindet sich damit im internationalen Vergleich im Mittelfeld (Ring 2004).

Die meisten allergenen Proteine sind in der Pollenwand lokalisiert (Emberlin 1995). Aber auch im Inneren von Pollen konnten Allergene nachgewiesen werden (Behrendt et al. 1999, Sliwa-Tomczok et al. 2001). Das Vorhandensein von Allergenen muss nicht unbedingt auf Pollen restringiert sein. Auch in anderen Pflanzenteilen der Birke, wie den Blättern und den Wurzeln, sind Allergene nachgewiesen worden (Grote und Fromme 1986, Puc 2003, Poupard 1998). Allergene werden schnell aus den Pollen in ein wässriges Milieu entlassen. Es handelt sich dabei um Proteine bzw. Glykoproteine mit einer molekularen Masse von 10-70 kDa. Der Pollen selber ist zu groß um in die Bronchien eindringen zu können. Da Pollen jedoch, wenn sie feucht werden, zerplatzen (Grote et al. 2000), könnten kleinere Pollenteilchen, z.B. die Stärkekörner an denen Allergene anheften, weit in die Lungen eindringen und so allergisches Asthma auslösen (Taylor et al. 2002, 2003). So zeigte Taylor et al. (2002), dass nach osmotischen Veränderungen in Gräserpollen 500-700 Stärkemoleküle, beladen mit Allergenen, hauptsächlich durch die Pollenpore freigesetzt werden können (Taylor et al. 2002). Zusätzlich werden sogenannte „Uebish Bodies“ (Orbicules) von Pollen aus dem Tapetum freigesetzt, die ebenfalls Allergene enthalten (Vinckier et al. 2001). Dadurch wird das Eindringen in tiefere Atemwege möglich. Dies wurde vor allem an dem Allergen des Wiesenlieschgraspollen Phl p 6 gezeigt. Mittels Immunogold Elektronenmikroskopie stellte sich heraus, dass Phl p 6 hauptsächlich auf P-Partikeln reifer Pollen lokalisiert war (Vrtala et al. 1999). P-Partikel sind schmale „Polysaccharide-containing wall-precursor bodies“ die bei der

Pollenschlauchbildung wichtig sind. Die Tatsache, dass Phl p 6 häufig mit diesen kleinen P-Partikel assoziiert ist, könnte von klinischer Bedeutung sein, da kleine mit Allergen beladene Partikel weiter in die Lunge einwandern und hier Entzündungsreaktionen auslösen können (Vratala et al. 1999). Besonders bei Stürmen nimmt die Zahl der Asthmafälle bedeutend zu (Newson et al. 1997). Dies wird auf ein vermehrtes Vorhandensein von kleinen mit Allergen beladenen Partikeln zurückgeführt (Schäppi et al. 1999 a, b).

Die Funktion der meisten Allergene der Pollen wird darin gesehen, dass diese beteiligt sind bei der eigenen Arterkennung und der Übertragung des männlichen Genoms. Dies wird hauptsächlich dadurch begründet, dass die Allergene sehr schnell in feuchtem Milieu löslich sind und somit rasch mit ihrer Umwelt in Kontakt treten. Dies hat jedoch auch zur Folge, dass das Allergen relativ schnell in die menschliche Schleimhaut eintritt und bei sensibilisierten Personen allergische Reaktionen auslösen kann. Ihre allergene Eigenschaft erhalten Allergene dadurch, dass sie mindestens zwei Epitope für das IgE besitzen. Es konnte jedoch keine einheitliche Sequenz des Epitopes für die bekannten Allergene gefunden werden. Vielmehr ist die dreidimensionale Konformation ausschlaggebend für die Bindung an IgE (Bufe 1998). Die biologische Funktion der Allergene ist sehr unterschiedlich und zum Teil nicht restlos aufgeklärt. Je mehr über ihre Funktionen bekannt wird, desto deutlicher wird, dass die Allergene verschiedenen bereits bekannten Proteingruppen zugeordnet werden können (Behrendt und Becker 2001). So besitzt z.B. Phl p 5 Nuklease-Aktivität, während Phl p 1 zu den Cystein Proteasen gehört. Die Enzymaktivität der Allergene kann eventuell zusätzlich eine Bedeutung bei der Sensibilisierung spielen, indem es zur Irritation der Haut und dem daraus leichteren Eindringen des Allergens kommen könnte. Zum Beispiel inaktiviert das Hausstaubmilbenallergen Der p 1 das Alpha1-antitrypsin, welches normalerweise die unteren Atemwege vor proteolytischen Beschädigungen schützt und dadurch könnte es zu vermehrten Entzündungs-Erscheinungen kommen (Kalsheker et al. 1996). Viele Allergene besitzen zudem Sequenzähnlichkeiten mit Proteinen, die zu den „Pathogenesis related“ (PR)-Proteinen gehören. Es gibt 14 Gruppen von PR-Proteinen, die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten und ähnlichen enzymatischen und biologischen Funktionen eingeteilt werden (van Loon van Strien 1999, Hofmann-Sommergruber 2000). Von den Pflanzenallergenen, die in der offiziellen Datenbank der International Union of Immunological Societies aufgelistet sind,

gehören ungefähr 25% zu den PR-Proteinen (Hoffmann-Sommergruber 2002). Bis jetzt konnten Allergene den PR-Protein-Familien 2, 3, 4, 5, 8, 10 und 14 zugeordnet werden (Midoro-Horiuti et al. 2001). Diese Proteine sind erhöht exprimiert nach Stress-Stimulus, sei es durch Pathogenbefall der Pflanze oder abiotische Faktoren, die sowohl auf die Pflanze als auch den Pollen einwirken können. Der PR-2 Familie sind beta-1,3-Glukanasen zugehörig. Ihre Funktion wird sowohl in der Pathogenabwehr, aber auch bei Entwicklungsprozessen gesehen (Hoffmann-Sommergruber 2002). Chitinasen der Klasse I, II, IV gehören in die PR-3 Familie und sind erhöht exprimiert bei Insekten- bzw. Pilzbefall. Pflanzenchitinasen sind meist Endochitinasen, die Chitin hydrolisieren, das ein Hauptbestandteil des Exoskelett von Insekten ist, aber auch in der Zellwand vieler Pilze und Nematoden vorkommt. Neuhaus et al. (1991) haben die Chitinasen anhand ihrer Sequenzähnlichkeiten in 7 Klassen eingeteilt. Auch in anderen PR-Familien gibt es Proteine, die Chitinase-Aktivität aufweisen. So z.B. gehören in die PR-4 Familie Chitinasen der Klasse II und III. Diese Proteine sind wichtig bei mechanischer Verwundung. Traumatin-ähnliche Proteine werden bei biotischem und abiotischem Stress vermehrt gebildet und gehören zu der PR-5 Familie. In die Klasse der PR-8 Familie sind Chitinasen III zugehörig, die eine Rolle bei Wundheilungsprozessen spielen (Hoffmann-Sommergruber 2002). Das Hauptallergen der Birke Bet v 1 zeigt Sequenzhomologien zu dem PR-Protein der Gartenerbse und ist den PR-10 Proteinen zugeordnet. Die Funktion des Allergens ist nicht eindeutig aufgeklärt. So beschrieben Bufe et. al (1995, 1996), dass das 17 kDa Hauptallergen Bet v 1 Ribonukleaseaktivität besitzt. Markovic-Housley et al. (2003) hingegen sehen die Funktion von Bet v 1 als Steroidträger. Mogensen et al. (2002) zeigten, dass Bet v 1 an mehrere physiologisch relevante Liganden z.B. Flavonoide oder Cytokine binden kann. Mehr als 20 Isoformen dieses Allergens sind bisher beschrieben worden, die sich vor allem in ihrer IgE Bindungskapazität unterscheiden. Eine andere PR-Familie sind die Lipid-transfer-Proteine, die PR-Familie 14, die eine Rolle bei Abwehrprozessen spielen (Hoffmann-Sommergruber 2002).

Nicht alle Allergene gehören zu den PR-Proteinen. Mehrere Allergene sind Strukturproteine, wie z.B. das Birkenallergen Bet v 2, ein Profilin. Dies ist ein 15 kDa großes Protein, das als Aktin bindendes Protein als Stabilisator im Cytoskelett beteiligt ist. Profiline sind in allen Eukaryonten zu finden und sind Panallergene.

### **1.3.2 Antioxidantien in Pollen**

Pollen enthalten nicht nur Allergene, sondern auch Antioxidantien, die protektiven Charakter besitzen, da sie freie Radikale auffangen und so die Zelle vor möglichen oxidativen Schäden schützen (Nagai 2002, 2005). Besonders in der äußeren Schicht der Pollen, der Exine, befinden sich diese antioxidativen Substanzen (Gubatz et al. 1986, Wiermann et al. 1983). Es wird davon ausgegangen, dass diese Substanzen zum Schutz vor Umweltschädigungen, besonders vor hoher UV-Strahlung, gebildet werden (Wiermann et al. 1972, Meurer et al. 1988). Besonders phenolhaltige Substanzen kommen in Pollen vor. So sind Flavonoide wie Kampferole, Kaffeesäureester, Hydroxyzimtsäuren und Quercetin in Pollen nachgewiesen worden (Campos et al. 1997, Linskens und Jorde 1997, Strack 1981, Ferreres et al. 1989). Diesen antioxidativen Substanzen im Pollen wurden z.B. die gesunde Wirkung des Honigs zugeschrieben (Nagai et al. 2001).

### **1.3.3 Proinflammatorische und immunmodulierende Substanzen (PALMs) in Pollen**

Im Jahr 1999 konnten Behrendt et al. erstmals nachweisen, dass Pollen neben den Allergenen Lipidmediatoren freisetzen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu den Leukotrienen und Prostaglandinen in Säugetierzellen aufweisen und die proinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften besitzen. In wässrigen Pollenextrakten konnten die Lipidmediatoren Hydroxyoktadiensäure und Hydroxyoktatriensäure mittels HPLC in Pollen nachgewiesen werden. Diese sogenannten Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) induzierten bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten Chemotaxis und wiesen somit auch funktionelle Eigenschaften wie Leukotrien B<sub>4</sub> auf. (Kasche 2002, Traidl-Hoffmann 2002, Plötz 2004). Leukotriene, die durch Oxidationsprozesse entweder enzymatisch durch das Enzym Lipoxygenase oder autooxidativ entstehen, sind an Abwehr- und Entzündungsprozessen beteiligt (Samuelsson et al. 1987). Leukotrien wirkt als potentes Chemoattraktanz auf neutrophile Granulozyten durch die Bindung an den hochaffinen BLT1 Rezeptor und den niedrig affinen Rezeptor BLT2 (Yokomizo et al. 1997, 2001).

In Säugetierzellen leitet das Enzym Lipoxygenase den Stoffwechselweg zur Synthese von Leukotrienen ein. Nach einer Zell-Stimulation wird Arachidonsäure

freigesetzt und steht den Lipoxygenasen als Substrat zur Verfügung. Bis jetzt ist in höheren Pflanzen und insbesondere in Pollen noch keine Arachidonsäure nachgewiesen worden. In pflanzlichen Zellen stehen den Lipoxygenasen hingegen Linol- bzw. Linolensäure als Substrate zur Verfügung. Die Frage, die sich jetzt stellt, ist, ob dieses Enzym auch in Pollen selbst vorhanden ist. Es sind mehrere Isoenzyme des Enzyms bei verschiedenen Pflanzenarten beschrieben worden (Fuller et al. 2001, Fischer et al. 1999).

Pflanzenlipoxygenasen katalysieren die Addition von Sauerstoff an das C9- oder C13-Atom von Fettsäuren. Bei Gerste wurde gezeigt, dass die Bildung der entstehenden Substanzen sowohl autooxidativ als auch enzymatisch erfolgt. Diese Produkte wurden als 9-Hydroperoxyoktadekadiensäure (9-HPOD) und 13-Hydroperoxy-oktadekatriensäure (13-HPOD) bei Gerste bestimmt und 2% dieser Produkte wurden nach einer Stunde autooxidativ gebildet (Göbel et al. 2001). In mehreren Pflanzenarten ist Lipoxygenase mit deutlichen Sequenzähnlichkeiten beschrieben worden. Die Sequenzgleichheit der Gerste wird mit 86% zu der Lipoxygenase 3 von Sojabohne angegeben (Ealing und Casey 1988). Die Größe liegt ungefähr bei 100 kDa, bei der Erbse (*Pisum sativum*) z.B. bei 97,6 kDa (Ealing und Casey 1988). Die Funktion und Quantität von Lipoxygenasen in Pflanzen wurden von mehreren Forschergruppen untersucht, so z.B. wurde die Beteiligung der beta-Oxidation von mehreren Triglyceriden im Zusammenhang der Hochregulierung nach Keimungsvorgängen in Gurkenkeimlingen gezeigt (Feussner 2001, 1995, 1997). Auch in anderen Pflanzenarten konnten Änderungen im Expressionslevel der Lipoxygenase nach Stimulus festgestellt werden. Die Oxidation von Fettsäuren leitet die Synthese von Pflanzenhormonen wie Jasmonsäure (Siedow 1991, Kohlmann et al. 1999), antibakterielle Komponenten wie Hexenole und Hexanole (Schaffrath et al. 2000) und antifungale Komponenten wie Nonadienols, die durch Stressfaktoren vermehrt gebildet werden, ein. Lipoxygenase ist das Schlüsselenzym für den Lipidmetabolismus und das Stresssignalling (Holtman et al. 2000 a, b).

Die Oxidation von Lipiden durch die Lipoxygenase in Pollen ist vermutlich zur eigenen Arterkennung wichtig (Pruitt et al. 2000). Es wird immer deutlicher, dass Pflanzen ähnliche Signaltransduktionswege wie Säugetiere und Insekten benutzen, um Abwehrmechanismen zu aktivieren (Cohn et al. 2001, Nürnberger und Scheel 2001). Z.B. konnte bei *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass

durch Lipopolysaccharide Stickoxid zur Abwehr freigesetzt wurde, ein Signal, dass auch von Säugetierzellen zu diesem Zweck verwendet wird (Zeidler et al. 2004).

#### **1.4 Epidemiologische Daten zur Allergiezunahme**

Allergien haben in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen (Ring et al. 2001, Ring 2004, Taylor 1984, ISAAC 1998, Wüthrich 1989). Umweltänderungen jeglicher Form, die auf den Patienten einwirkten und oder aber auch auf den Allergenträger, müssen im Laufe der Zeit dazu geführt haben, dass sich die Immunitätslage verändern konnte und es zum vermehrten Auftreten von Allergien kam. Statt der T-Helferzellen 1 ( $T_{H1}$ ) - Immunantwort, findet eine T-Helferzellen 2 ( $T_{H2}$ ) dominierende Immunantwort statt, die bei allergischen Entzündungsreaktionen abläuft (Black et al. 2001). Die Zunahme von Allergien wird von vielen Wissenschaftlern in zahlreichen Ländern vor allem durch epidemiologische Studien belegt. In Japan z.B. hat die Allergie auf Zedernpollen dramatisch zugenommen. Im Jahr 1981 hatten bereits 26% der Kinder einen positiven Pricktest und erhöhtes allergenspezifisches IgE auf Zedernpollen. 15 Jahre später war ein noch deutlicherer Anstieg zu verzeichnen. Bereits mehr als die Hälfte der Kinder (56%) wiesen 1996 eine Allergie auf Zedernpollen auf (Masuda et al. 1998). Dahl et al. (2004) errechneten eine Prävalenzrate von respiratorisch allergischen Erkrankungen in Europa von 24,4%, wobei nationale Unterschiede festgestellt wurden. Spanien liegt mit 11,7% am niedrigsten, wohingegen Italien die höchste Prävalenzrate von 33,6% aufweist. Deutschland liegt im Mittelfeld bei einer Prävalenzrate von 23,5%. Das Risiko an einer Allergie zu erkranken, war negativ korreliert mit dem Alter. Es zeigte sich aber, dass auch in der Gruppe der 50-60 jährigen das Risiko, eine Allergie zu bekommen, immer noch vorhanden ist (Dahl et al. 2004). In Schweden nahm in zehn Jahren von 1971-1981 die allergische Rhinitis von 4,4% auf 8,4% zu (Aberg 1989). Dieser Zunahmetrend war auch in den folgenden zehn Jahren weiterbeobachtet worden (Aberg et al. 1995). In Schottland wurden die Prävalenzraten von Atmungskrankheiten von Schulkindern in Aberdeen mittels Fragebögen in den Jahren 1964 und 1989 analysiert. Die Asthmaerkrankungen stiegen von 4,1% auf 10,2% und Heuschnupfen nahm von 3,2% auf 11,9% zu (Ninan und Russell

1992). In der Schweiz stieg die Zahl der an Heuschnupfen Erkrankten von 0,8% 1926 auf 14,2% 1991 (Wüthrich et al. 1995). Dies sind dramatische Zunahmen, die weltweit zu beobachten sind.

Mehrere Hypothesen, um den Trend der Zunahme von Allergien zu erklären, wurden entwickelt. Auszüge daraus werden im folgenden vorgestellt, um die Komplexität der Zusammenhänge zu verdeutlichen. Vermutlich wirken hierbei mehrere Einfluss-Faktoren gleichzeitig (Ring 2001).

## **1.5 Erklärungsmodelle für die Allergiezunahme**

Es gibt zahlreiche Publikationen, die sich mit Erklärungsmodellen für die Allergiezunahme beschäftigen (Ring 2004, für weitere Literaturhinweise Ring et al. 2001). Im folgenden werden wichtige Faktoren ausgeführt.

### *Psycho-soziale Komponente und westernisierter Lebensstil (sozioökonomisch)*

Einer der wichtigsten Punkte in diesem Zusammenhang ist höchstwahrscheinlich die psycho-soziale Komponente und ein westernisierter Lebensstil. Der Lebensstandard hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich vor allem in den Industriestaaten verändert. So ist es nur verständlich, dass diese Veränderungen für die steigende Allergieprävalenz verantwortlich gemacht werden. Zahlreiche epidemiologische Studien stellten bereits einen Zusammenhang mit verschiedenen sozioökonomischen Faktoren fest. Es zeigte sich, dass Kinder aus Familien, bei denen die Eltern eine gute Ausbildung genossen haben, häufiger sensibilisiert sind (Hermann-Kunz und Thierfelder 2002). Dies läuft parallel mit fallenden Zahlen an Geburten und kleineren Haushalten. Auch bekommen Akademiker zu einem späteren Lebensabschnitt Kinder als Nicht-Akademiker. Auch das veränderte Freizeit-Verhalten von Kindern, mehr Fernsehen und Computerspiele sowie geringeres aktives Spielen im Freien, rief die Bedeutung der Innenraumluft auf den Plan. Auch Tapeten und Teppiche in den Häusern wurden bei prädisponierten Kindern als allergiefördernd eingestuft. Mehrere Studien konnten eine vermehrte Belastung der Wohnung mit Hausstaubmilben mit dem erhöhten Risiko an einem atopischen Ekzem zu erkranken, korrelieren (Krämer et al. 2004). Auch die Allergenexposition veränderte sich, da zum Beispiel immer mehr exotische Früchte exportiert und verzehrt werden. Durch die

Berufstätigkeit von beiden Elternteilen musste die Zeit, die zum Kochen aufgewendet wird, deutlich reduziert werden. Die Wirtschaft reagierte mit Fast food und Auftaukost. Immer mehr Haushalte halten Haustiere, so dass sich die Allergenlast deutlich erhöht hat (Melén et al. 2001). Die gesellschaftliche Akzeptanz, die zulässt, dass auch junge Leute rauchen, schien zu steigen, womit die Zahl junger Raucher beachtlich zunahm. Auch Passivrauchen führte zur Verstärkung der allergischen Symptome und dem Risiko an einer Allergie zu erkranken (Sturm et al. 2004, Krämer et al. 2004), wobei hier auch die Schadstoffe im Tabakrauch eine Rolle spielen dürften.

All dies sind Beispiele sozialer Entwicklungen, die mit der Zunahme allergischer Erkrankungen einhergehen und in epidemiologischen Studien aufgefallen sind.

#### *Bessere Information der Bevölkerung und Diagnostik-Möglichkeiten der Ärzte*

Eine weitere Hypothese besagt, dass eine bessere Information der Bevölkerung und Diagnostik-Möglichkeiten der Ärzte die Allergiezahlen steigen ließ. Dafür spricht, dass zum einen das Krankheitsbild allergischer Entzündungsreaktionen immer mehr in die Öffentlichkeit gelangte und zusätzlich die diagnostischen Mittel in der Allergologie verbessert wurden. Dies könnte bedeuten, dass die erhöhten Allergieraten in der Bevölkerung darauf beruhen, dass Patienten Allergietests fordern und der Arzt eine Allergie besser diagnostizieren kann. Dies hätte zur Folge, dass die Zahlen statistisch in die Höhe getrieben würden und die beobachteten Veränderungen nur scheinbar existierten. Dagegen spricht, dass die Diagnostikmethoden sich zwar verbesserten, aber schon lange verwendete, bewährte, Methoden heute immer noch eingesetzt werden. Darüberhinaus konnten Studien, die darauf ausgelegt waren nur Ergebnisse zu vergleichen, die mit gleichen Methoden eine Allergie feststellten, diese These nicht stützen (Ring 2001). Somit können verbesserte Diagnosemethoden nicht allein für den erwähnten Anstieg der Allergieprävalenz verantwortlich sein (Hill et al. 1989)

#### *Urwald-Hypothese*

In vielen Ländern haben sich die hygienischen Standards deutlich verbessert. Die Kreuzvernetzung der Immunoglobine E (IgE), die an Mastzellen oder basophilen Leukozyten anheften durch das Einfangen des Allergens, führen zur Ausschüttung von Histamin und der daraus resultierenden allergischen Entzündung. IgE wird

hauptsächlich beim Abwehrmechanismus gegen Wurm- und Parasiteninfektionen vermehrt gebildet. Diese Infektionen sind in den Industriestaaten deutlich zurückgegangen, so dass die These besteht, dass das Immunsystem nicht richtig ausgelastet ist und es somit zu Überreaktionen bzw. Deregulationen kommen kann (Romagnani 2004). Das Immunsystem reagiert dabei bereits auf harmlose Substanzen mit deutlichen Abwehrmechanismen. Studien an der Bevölkerungsgruppe der Waorani in Ecuador, deren Immunsystem sich mit zahlreichen Wurm- und Parasiteninfektionen auseinandersetzen musste, zeigten erhöhte Werte an IgE, aber deutlich geringere Prävalenz für Allergien (Larrick et al. 1983). Auch im Osten von Deutschland, mit geringerem Vorkommen an Rhinokonjunktivitis im Jahr 1990, waren der Parasitenbefall und der IgE-Spiegel bei Kindern erhöht gegenüber den Kindern, die im Westen aufgewachsen sind (Ring et al. 1999, Heinrich et al. 2002).

### *Hygiene-Hypothese*

Diese These nimmt an, dass es durch fehlende Stimuli für eine  $T_{H1}$ -Antwort zu vermehrtem Auftreten von Allergien kommen könnte. Demnach sollten Kinder, die im frühen Kindesalter häufig an Infektionen ( $T_{H1}$ -Antwort) erkrankten, weniger Allergien entwickeln. So konnte Krämer et al. (1999a) zeigen, dass Kinder, die im Alter von sechs bis elf Monaten in eine Kinderkrippe kamen, deutlich weniger Allergieprävalenzen zeigten als Kinder, die später in die Krippe eintraten. Zudem gelten große Haushalte mit vielen Geschwistern als protektiv für die Allergieprävalenz (Strachan et al. 1996). Desweiteren wird diese These gestützt dadurch, dass Landkinder, deren Immunsystem ständig durch mikrobielle Produkte ( $T_{H1}$ -Antwort), die durch Farmtiere freigesetzt werden, stimuliert ist, weniger Allergien entwickelten als Stadtkinder (Braun-Fahrlander et al. 2002, 2003). Der genaue Mechanismus, wie es zur  $T_{H2}$ -Antwort, typisch für allergische Erkrankungen, durch das Fehlen von pathogenen Stimuli kommen kann, wird heftig diskutiert. Die ursprüngliche Meinung vertrat die Ansicht, dass bei einer Allergenstimulation zu wenig Zytokine für eine  $T_{H1}$ -polarisierende-Antwort gegenüber einer  $T_{H2}$ -Antwort gebildet werden (Romagnani 1994, Martinez 2001). Es konnte *in vitro* unter anderem gezeigt werden, dass dendritische Zellen durch Pollensubstanzen moduliert werden können, so dass es zu einer Verminderung der Zytokinproduktion des Interleukins-12 und der daraus resultierenden Erhöhung

der Polarisierung der T-Zellen hin zu einem T<sub>H2</sub>-Phänotyp kommt (Traidl-Hoffmann et al. 2005). Auch eine geringere Aktivierung von T-regulatorischen Zellen (Treg) und der daraus resultierenden verminderten Immunrunterregulierung wird als Ursache für vermehrt auftretende Allergien gesehen (Yazdanbakhsh et al. 2002, Bach 2002).

#### *Zunahme der Umweltbelastung mit anthropogenen Stoffen*

Die starke Zunahme von Allergien könnte unter anderem auch mit der stetig steigenden Umweltbelastung zusammenhängen (Rusznak et al. 1994, d'Amato et al. 2002 a, 2002 b). Der Einfluss der Umwelt kann hierbei direkt auf den Allergenträger, aber auch auf den Menschen beruhen. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit, ist der Einfluss von Umweltbelastung auf allergene Pollen. Im nächsten Kapitel wird deswegen ausführlicher auf diesen Aspekt eingegangen.

### **1.6 Studien zum Einfluss von Umweltschadstoffen auf die Allergieentwicklung**

Seit deutlich wurde, dass Umweltschadstoffe einen negativen Einfluss auf die menschliche Gesundheit haben, wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, um die Emission von Schadstoffen zu minimieren. Eine weitere Reduktion der Umweltbelastung stellt eine enorme Herausforderung dar. Gesundheitliche Nachteile durch die Exposition von Umweltschadstoffen sind in zahlreichen Studien veröffentlicht worden, wobei meistens die mutagenen, toxischen und krebserregenden Eigenschaften der Substanzen im Vordergrund standen. Der Einfluss verschiedener Umweltschadstoffe auf die Allergieentstehung weckt seit dem Bekanntwerden zunehmender Allergieprävalenz vermehrt öffentliches und wissenschaftliches Interesse (Ring et al. 1995). Direkte und indirekte Einflussfaktoren der Umweltschadstoffe, welche die erhöhten Allergieprävalenzen erklären könnten, werden diskutiert. Demnach können Umweltschadstoffe die Schleimhaut direkt schädigen und dadurch zur Aggravierung der allergischen Symptomatik beitragen (Devalia et al. 1994, Molfino et al. 1991). Zudem können Umweltschadstoffe eine adjuvante Wirkung haben und eine Sensibilisierung erleichtern (Diaz-Sanchez et al. 1999). Aber auch eine direkte Wirkung von

Umweltschadstoffen auf den Allergenträger könnte zur Modulation von allergischen Reaktionen führen (Behrendt et al. 1997).

Bis jetzt ist nicht ausreichend geklärt, durch welchen Mechanismus Umweltschadstoffe die allergischen Reaktionen beeinflussen (Tunnicliffe et al. 2001). Ein besonders interessanter Punkt liegt darin, den Einfluss von Umweltschadstoffen direkt auf den Pollen zu analysieren. Bis jetzt ist in Laborversuchen dieser Aspekt nur bei wenigen Pollenarten untersucht worden. Deswegen steht in der vorliegenden Studie die Untersuchung der Allergenträger im Vordergrund. Es ist denkbar, dass Pollen ihr allergenes Potential durch Umweltverschmutzung verändern (Behrendt et al. 1997, Armentia et al. 2002). Der modulierende Umwelteinfluss könnte bereits während des Wachstums der Pflanze, der Entwicklung des Pollens oder aber auch erst beim Pollen-Wind-Transport stattfinden. Der Pollen könnte sich molekularbiologisch und funktional derart verändern, dass er für den Menschen aggressiver würde.

Viele Hinweise zur Rolle der Luftverschmutzung auf die Allergie stammen aus epidemiologischen Studien, in denen die Häufigkeit oder der Schweregrad der Krankheit bei bestimmten Personengruppen mit den vorherrschenden Umweltbelastungen verglichen werden (siehe Tabelle 1.6.1). Im Ergebnis zeigten vier Studien einen Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und dem Symptom „Wheezing“ (pfeifende, fiepende Atemgeräusche). Zwei von diesen Studien, die in Münster und Bochum durchgeführt worden waren, berichten über einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Lastwagenverkehr in der Wohnstraße und Symptomen einer allergischen Rhinitis. In drei weiteren Studien wird über die Assoziation mit Asthma berichtet, drei andere konnten jedoch keinen derartigen Zusammenhang feststellen.

Tabelle 1.6.1: Epidemiologische Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Verkehrsbelastung und Allergien (aus Lemmen 2004, Sachverständigenrat 1999).

Referenzen	Titel der Originalarbeit (Probandenkollektiv/Ort )	Exposition	Ergebnis
Wjst et al. 1993	Road traffic and adverse effects on respiratory health in children 9-11 jährige Kinder (n=6537), München	Verkehrszählung	Verminderte Lungenfunktion (PEF); keine Zunahme von Asthma
Edwards et al. 1994	Hospital admissions for asthma in preschool children: Relationship to major roads in Birmingham, UK 0-4 jährige Kinder (n=2187)	Messung der Entfernung zur Straße	Assoziation mit Asthma
Luttmann et al. 1994	Kohortenstudie zu Atemwegserkrankungen und Lungenfunktion bei Schulkindern in Südwestdeutschland, Teil 4 8-16 jährige Kinder (n=3414), Mannheim	Messung der Verkehrsdichte	Keine Zunahme von Asthma
Schupp et al. 1994	Einfluss verkehrsbedingter Immissionen auf die Empfindlichkeit der Atemwege bei Kindern in Duisburg 10 jährige Kinder (n=511), Duisburg	Messung von NO <sub>2</sub> , Benzol, Toluol	Empfindlichkeit der Atemwege leicht erhöht
Weiland et al. 1994	Self-reported wheezing and allergic rhinitis in children and traffic density on street of residence 12-15 jährige Kinder (n=2050), Bochum	Lastwagenverkehr (eigene Angaben)	Rhinitis und "Wheezing" erhöht
Pershagen et al. 1995	Air pollution involving nitrogen dioxide exposure and wheezing bronchitis in children 0,3-4 jährige Kinder (n=547), Stockholm	NO <sub>2</sub> -Messung	"Wheezing" erhöht
Waldron et al. 1995	Asthma and the motorways – one district's experience 13-14 jährige Kinder (n=2387), East Surrey District, GB	Nähe zur Autobahn	Keine Assoziation mit Asthma

Referenzen	Titel der Originalarbeit (Probandenkollektiv/Ort )	Exposition	Ergebnis
Duhme et al. 1996	The association between self-reported symptoms of asthma and allergic rhinitis and self-reported traffic density on street of residents in adolescence 12-15 jährige Kinder (n=3703), Münster	Lastwagenverkehr (eigene Angaben)	Rhinitis und "Wheezing" erhöht
Osterlee et al. 1996	Chronic respiratory symptoms in children and adults living along streets with high traffic density 0-15 jährige Kinder (n=291); Erwachsene (n=1485), Haarlem, NL	Nähe zu stark befahrenen Straßen	"Wheezing" und Medikation erhöht
Studnicka et al. 1997	Traffic-related NO <sub>2</sub> and the prevalence of asthma and respiratory symptoms in seven years olds 7-9 jährige Kinder (n=843), 8 Orte in Niederösterreich	NO <sub>2</sub> -Messung	Asthma und weitere Atemwegssymptome erhöht
Van Vliet et al. 1997	Motor vehicle exhaust and chronic respiratory symptoms in Children living near freeways 7-12 jährige Kinder (n=1068), 6 Orte, NL	Verkehrsdichte, Entfernung zur Autobahn	Asthma und weitere Atemwegssymptome erhöht
Krämer et al. 2000	Traffic related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas 9 jährige Kinder (n=317), 3 innerstädt. Areale in Düsseldorf	Verkehrsdichte, NO <sub>2</sub> -Messung außen, personal sampler	Symptome der allergischen Rhinitis erhöht; Pollensensi- bilisierungen erhöht

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Atopierate bei Kindern mit der Stärke des Verkehrsaufkommen korreliert und das Risiko sensibilisiert zu werden zwei bis dreimal höher war, wenn man in der Nähe von stark befahrenen Straßen wohnte (Behrendt et al. 1995, Krämer et al. 2000). In Entwicklungsländern hat Bronchialasthma vor allem in städtischen und weniger in ländlichen Gebieten zugenommen (Weinberg 2000, Yemaneberhan et al. 2004). In Japan waren 1977 5,3% der Kinder auf Zedernpollen allergisch, während es 1981 schon 9,4% waren. Als Ursache wird die Zunahme des Autoverkehrs, insbesondere von Dieselfahrzeugen, angenommen (Ishizaki et al. 1987, Kusunoki et al. 2002). Aber

auch andere Umweltschadstoffe wie Schwefeldioxid zeigten ihre Wirkung. In Schweden konnten bei Kindern, die in Schwefeldioxid hoch belasteten Gebieten wohnen, vermehrt allergisches Asthma und überempfindliche Bronchien festgestellt werden, im Vergleich zu Kindern aus niedrig belasteten Gebieten (Montnemery et al. 2001, Irnell und Kiviloog 1968). Eine für Epidemiologen einmalige Situation entstand, als die Mauer zwischen West- und Ostdeutschland 1989 fiel. Dies ermöglichte es, zwei Populationen mit gleichen genetischem Hintergrund zu studieren, die sich 40 Jahre unterschiedlich entwickelten. Zusätzlich konnte die nach 1989 folgende Wiederableichung der Lebensbedingungen analysiert werden. Vergleichsstudien zur Allergieprävalenz zeigten, dass im Westen allergische Rhinitis und allergisches Bronchialasthma häufiger auftraten, während im Osten vermehrt Entzündungen in den oberen Atemwegen und auch atopisches Ekzem zu verzeichnen waren (Krämer et al. 2002). Die Befunde im Osten konnten mit der vermehrten Schadstoffbelastung des klassischen Typs z.B. Schwefeldioxid und Grobstaub assoziiert werden. Im Westen hingegen war die Schadstoffbelastung vorherrschend, die hauptsächlich verkehrsbedingt ist und mit allergischer Sensibilisierung zusammenhängt (Behrendt et al. 1995, 2001a), (siehe Punkt 1.7). Folgestudien nach fünf Jahren zeigten, dass die Zahl an Heuschnupfenvorkommen nicht weiter ansteigt (Weiland et al. 1999, Heinrich et al. 1998). Dies könnte bedeuten, dass die Angleichung der Umweltbedingungen auch zu einem vergleichbaren Sensibilisierungsrisiko geführt hat.

Weitere Studien legten den Hauptaugenmerk auf Korrelationen des Schweregrades der Erkrankung mit den Konzentrationen an Umweltschadstoffen (Holz et al. 2002, Jörres et al. 1990, 1995, 1996, Magnussen et al. 1990, Molfino et al. 1991, Rusznak et al. 1994, 1996, Bascom et al. 1990, Delfino et al. 1994, Tunnicliffe et al. 1994). Bei Birken- und Graspollen-Allergikern zum Beispiel, konnte ein deutlicher Zusammenhang bereits bei niedrigen Ozon-, Schwefeldioxid- und Stickstoffdioxid-Konzentrationen mit dem Auftreten allergischer Symptome festgestellt werden (Riediker et al. 2001). Kinder konnten als eine ausgesprochen sensible Patientengruppe herausgestellt werden: je verkehrsreicher, vor allem durch LkW-Aufkommen, ihr Wohnungsumfeld war, desto stärker zeigten sie allergische Symptome (Janssen et al. 2003). Ussetti et al. (1984) untersuchten das plötzliche Asthma-Aufkommen in Barcelona 1983 und fanden einen direkten

Zusammenhang zu den Konzentrationen an Stickstoffoxiden und Krankenhauseinlieferungen durch Atembeschwerden. In Australien zeigten Henry et al. 1991, dass Vorschulkinder, die in der Nähe von Kraftwerken wohnten, eine doppelt so hohe Prävalenzrate an Asthma aufwiesen, als Kinder in schadstoffärmeren Gebieten. In Seattle fanden Schwartz et al. (1993) heraus, dass die Zahl der Ambulanzfälle von Asthmapatienten unter 65 Jahren mit den gemessenen Feinstaubkonzentrationen  $PM_{<10}$   $\mu m$  am Tag vor, noch besser vier Tage vor der Krankenhauseinlieferung, stark assoziiert waren. Es wurde hypothetisiert, dass Allergene an Partikeln kleben, die bis weit in die Lunge eindringen können und hier allergische Entzündungs-Reaktionen auslösen (Schäppi et al. 1999 a, b). Durch wissenschaftliche Studien konnte eine adjuvante Wirkung dieser Partikel bei der Allergieentstehung gezeigt werden (Behrendt und Becker 2001, Diaz-Sanchez 1997, 1999, Knox und Suphioglu 1997, Takafuji 1989, Hitzfeld et al. 1997).

In zahlreichen Provokationsstudien an Allergikern wurde der Einfluss von verschiedenen Luftschadstoffen auf den Schweregrad der allergischen Reaktionen untersucht. So konnten Tunnicliffe et al. (2001) bei allergischen Asthmapatienten zeigen, dass nach einer Graspollen-Allergenchallenge es zu einem Abfall in der Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) von -18,4% kam, wenn die Patienten 14 Stunden vor Allergenchallenge für eine Stunde gegenüber Schwefeldioxid-Aerosolen exponiert waren. Ammoniumbisulfatkonzentrationen von bis zu 2000  $\mu g/m^3$  oder Schwefeldioxidexpositionen von 200 ppb ohne Allergenexposition führten weder bei Kontrollpersonen noch bei Asthmapatienten zu wesentlichen Unterschieden in der Lungenfunktion (Tunnicliffe et al. 2003). Diaz-Sanchez et al. (1997) konnten zeigen, dass Koexpositionen von Dieselpartikeln und Traubenkraut-Allergenen bei allergischen Patienten die spezifische IgE Produktion verstärkten und das Zytokinprofil in die  $T_{H2}$ -Richtung drückte. Fujieda et al. (1998) fanden zudem heraus, dass es nach einer Exposition von Dieselpartikeln und Beifuß-Allergenen zur erhöhten IgE-Freisetzung in der Nasenmukosa kam.

Vielfach in Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass nach der Exposition von verschiedenen Luftschadstoffen ein erhöhtes Risiko für allergische Entzündungen bestand, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nur zum Teil aufgeklärt ist.

---

Meerschweinchen reagierten nach einer mehrtägigen Exposition mit Schwefeldioxid und anschließender Exposition mit dem Allergen mit einer Produktion von allergenspezifischem IgE. Bei den Kontrolltieren, die reine Luft zum Atmen bekamen, erfolgte diese Reaktion nicht (Riedel et al. 1988). In einer weiteren Studie an Mäusen trat eine erhöhte Sensibilisierungsrate bei den Tieren auf, die kurz vor der Allergenexposition einer Exposition mit ultrafeinen Partikel ausgesetzt waren (Alessandrini et al. submitted). Dieselrußpartikel konnten bei Mäusen ein T<sub>H2</sub>-Cytokin-Sekretions-Muster auslösen (Finkelman et al. 2004). Sensibilisierte Mäuse zeigten eine doppelt so intensive Reaktion im Haut-Prick-Test auf einen Extrakt von *Canna indica*-Pollen, wenn sie aus Teheran Stadt gesammelt wurden im Vergleich zu Pollen, welche außerhalb der Stadt gesammelt wurden. Auch die Zahl der Neutrophilen und Eosinophilen im Blut war bei der Gruppe, die mit Extrakt von stark umweltbelasteten Pollen provoziert wurden, zweifach erhöht (Majd et al. 2004). Auch auf den Pollen-Extrakt von *Zianna elegans*, ebenfalls aus Teheran, zeigten Meerschweinchen deutlich stärkere Reaktionen im Haut-Prick-Test als Pollen von niedriger belasteten Gebieten (Chehregani et al. 2004). In Tiermodellen konnte auch die adjuvante Wirkung von Dieselpartikeln untersucht werden, die in Tabelle 1.6.2 zusammengefasst sind.

Tabelle 1.6.2: Adjuvante Effekte von Partikeln, insbesondere Dieselpartikeln, aufgezeigt in Tiermodellen (nach Nel et al. 1998).

Referenzen	Adjuvante Effekte von Partikeln
Muranaka et al. 1986	Increased total IgE production
Takafuji et al. 1989; Suzuki et al. 1993; Fujimaki et al. 1994, 1995, 1997	Allergen-specific IgE enhancement after intraperitoneal, intranasal, intratracheal, inhalational, or foot pad challenge with particles mixed with allergen in mice
Fujimaki et al. 1994, 1995, 1997	Increased IL-4 production in mediastinal lymph nodes after intratracheal or inhalational challenge in mice
Lovik et al. 1997	Increased local inflammatory response in popliteal lymph nodes after footpad challenge
Takano et al. 1997	Induction of a T-helper 2-like cytokine profile in the airway in mice
Kobayashi et al. 1995, 1997	DEP enhance sneezing frequency, secretion volume, and nasal airway resistance in a histamine-induced rhinitis model in guinea pigs
Kobayashi et al. 1995	DEP increase vascular permeability in parallel with increased nasal airway resistance in guinea pigs
Sagai et al. 1996; Ichinose et al. 1997; Miyabara et al. 1998	Enhancement of airway constriction, eosinophilic inflammation, goblet cell hyperplasia after intratracheal or inhalational challenge

Modifikationen von Pollen durch Schadstoffeinfluss ist in mehreren Studien gezeigt worden. Verschiedene *in vitro* Schadstoffexpositionen an Pollen sind mit unterschiedlichen Luftschadstoffen bei verschiedenen Arten durchgeführt worden. Mehrere Effekte auf Protein- und Allergen-Ebene zusätzlich zu morphologischen Veränderungen konnten bei einigen Pollen-Arten gezeigt werden. Ruffin et al. (1986) konnten zeigen, dass Schadstoffe einen Einfluss auf Pollen hatten, es jedoch artspezifische Unterschiede gab. Nach einer Exposition mit SO<sub>2</sub>, CO und NO<sub>2</sub> von *Quercus rubra*-, *Festuca elatior*- oder *Ulmas pumila*-Pollen veränderte sich ihre Zusammensetzung an freien Aminosäuren. Bei *Ulmas pumila* verdoppelte sich bei schadstoffexponierten Pollen der Gehalt an freien Aminosäuren. Bei *Festuca elatior*-Pollen hingegen wurde durch Schadstoffexposition der Gehalt geringer. Bei einer weiteren *in vitro* Expositions-Studie wurden Birken- und Roggen-Pollen mit NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> oder Ozon verschiedener Konzentration exponiert. Pollenextrakte mit gleichem Proteingehalt wurden mit

Basophilen, die aus Vollblut von Birken- bzw. Roggen-Allergikern isoliert wurden, inkubiert. Die Histaminausschüttung war dabei größer bei schadstoffbelasteten Pollen als bei den nativen Pollen. Die Prick-Testung der Patienten zeigte, dass mit Luftschadstoffen exponierte Birken- und Roggen-Pollen stärkere Reaktionen als die entsprechenden nativen Pollen auslösten (Thomas et al. 1997). Risse (2000) konnte bei *in vitro* im Wirbelschichtreaktor mit VOCs exponierten Pollen eine deutliche Erhöhung der Pollen-assoziierten Lipidmediatoren gegenüber den Kontrollen finden. Bei einer *in vitro* Exposition von Graspollen mit SO<sub>2</sub> zeigte sich eine konzentrationsabhängige Verminderung der Allergenfreisetzung. Bei einer *in vitro* Exposition von Pollen mit VOCs hingegen erhöhte sich die Proteinfreisetzung (Risse 2000).

In Freiland-Versuchen bzw. bei der Gewinnung des Pollenmaterials direkt von der Mutterpflanze wird das Bestimmen der Einflussparameter erschwert, da auf die Pflanzen zahlreiche Faktoren, unabhängig von der Umweltverschmutzung einwirken. Bei Oberflächenstudien von *Phleum pratense*-Pollen konnten Veränderungen bei gesammelten Pollen nahe einer verkehrsreichen Straße festgestellt werden. Zudem setzten die verkehrsbelasteten Pollen mehr PALMs frei (Behrendt et al. 1999). Bei *Lolium perenne*-Pollen konnten laut Armentia et al. (2002) im Vergleich von städtischen zu ländlichen Gebieten deutliche Unterschiede festgestellt werden. Der Proteingehalt war in städtischen Pollen deutlich erhöht. Zudem war die biologische Aktivität des Allergens Lol p 5 deutlich erhöht bei städtischen Pollen (Armentia et al. 2002). Auch bei *Canna indica*-Pollen aus dem Iran veränderten sich durch Schadstoffmodulation die Immunoblotbanden: Bei den belasteten Pollen waren zwar weniger, dafür aber andere Allergen-Banden im Blot sichtbar im Vergleich zu gering belasteten Pollen. Zusätzlich konnte weniger Protein aus Stadt-Pollen gegenüber niedriger belasteten Pollen extrahiert werden (Majd et al. 2004). Bei Untersuchungen zum Stresseinfluss mit *Cypressus arizonica*-Pollen aus Spanien, die zum einem von wenig umweltbelasteten Gärten und zum anderen von hoch belasteten Gebieten stammten, zeigte sich im Immunoblot bei den belasteten Pollen eine neue Bande bei 23 kDa (Cortegano et al. 2004). In Haut-Prick-Testungen wurde der Unterschied im allergischen Potential besonders deutlich. Bei den Untersuchungen, bei denen Pollen aus belasteten Gebieten verwendet wurden, zeigte sich eine deutlich intensivere Reaktion gegenüber unbelasteten Pollen

(Cortegano et al. 2004). Versuche an *Brassica rapa* konnten zeigen, dass sich bei Zugabe von Salizylsäure, einem Signalmolekül, welches bei pathogenem Befall von Pflanzen hochreguliert wird, neue Allergenprofile ausbildeten (Hänninen et al. 1999).

Nach Lage der Literatur können Luftschadstoffe durch verschiedene Wege zur Allergieentstehung und Manifestation beitragen: Erstens einen indirekten, irritativen Einfluss durch Vorschädigung der Haut und Schleimhäute, was die Allergenpenetration erleichtern könnte und einen adjuvanten Einfluss für die Allergieentstehung bedeuten könnte. Zweitens eine direkte Wirkung auf, an der Allergieentstehung beteiligten Zellen, wie die B-Zellen und dendritische Zellen. Drittens Wechselwirkung der Schadstoffe mit den Allergenträgern selbst, die dadurch in ihrer Aggressivität und Allergenität verstärkt werden.

## 1.7 Umweltrelevante Schadstoffe

Das Forschungskonzept der Allergotoxikologie wurde eingeführt, um die Untersuchungen zum Einfluss von Umweltschadstoffen auf die Induktion und Chronifizierung von allergischen Erkrankungen voranzutreiben (Behrendt et al. 1995, 2001a). Zur konventionellen Schadstoffbelastung zählen hohe Konzentrationen an Schwefeldioxid und Partikel mit  $>10 \mu\text{m}$  aerodynamischen Durchmesser. Das heißt, es handelt sich um Umweltschadstoffe, die von Quellen im Freien emittiert werden. Diese Schadstoffe sind mit Infektionen und Erkrankungen der oberen Atemwege assoziiert. Heutzutage interessieren in Bezug auf allergische Erkrankungen hauptsächlich Umweltbelastungen, die mit Verkehr in Zusammenhang stehen, da diese Schadstoffe mit höheren Prävalenzraten an Allergie-Sensibilisierungen und allergischen Erkrankungen, ausgenommen atopische Ekzemen, assoziiert werden (Behrendt et al. 2001a, Ring et al. 2001). Diese umfassen sowohl Emissions-Quellen aus dem Innenraum als auch aus dem Außenraum. Feine und ultrafeine Partikel, flüchtige organische Substanzen (VOCs) und Ozon haben einen entscheidenden Anteil.

### *Schwefeldioxid*

Schwefeldioxid gehört zur Typ I Luftbelastung. Das Gas entsteht bei der Verbrennung von Kohle und anderen schwefelhaltigen Verbindungen. Der gesetzlich vorgeschriebene Einbau von Entschwefelungsanlagen führte zur deutlichen Verminderung von Schwefeldioxid in der Luft. Schwefeldioxid ist gut wasserlöslich und kann als Aerosol die Atemwege erheblich schädigen.

### *Stickstoffdioxid*

Die Konzentration von Stickstoffdioxid ist in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen. Dies ist auf die vermehrte Verbrennung von Benzin und Öl zurückzuführen. Vor allem das stetig steigende Verkehrsaufkommen trägt einen erheblichen Anteil zur Erhöhung der Stickstoffdioxidkonzentration in der Luft bei. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie Stickstoffdioxid an mehreren Standorten, an denen Pollen gesammelt wurden, gemessen. Die Stickstoffdioxid-Konzentration gewährleistet eine gute Korrelation mit dem Verkehrsaufkommen und ermöglicht es, den Einfluss von Verkehrsbelastungen auf Pflanzen und Pollen untersuchen zu können.

### *Flüchtige organische Substanzen (VOCs)*

Die Abgase der Kraftfahrzeuge enthalten auch flüchtige organische Substanzen (volatile organic compounds, VOCs). Ein typisches und in hohen Konzentrationen nachweisbares VOC-Gemisch von Toluol:m-Xylol:Benzol (von 3:2:1) stammt aus dem Straßenverkehr. Kenntnisse über gesundheitliche Schäden durch diese Substanzen sind vor allem durch Beschwerden am Arbeitsplatz bekannt geworden. In den maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK)- Richtlinien sind die MAK-Werte von Toluol mit  $190 \text{ mg/m}^3$  und von m-Xylol mit  $440 \text{ mg/m}^3$  angegeben (MAK-Liste 2001). Die MAK-Werte beziehen sich auf die Konzentration eines Stoffes in der Luft am Arbeitsplatz, die bei einer täglichen Exposition von acht Stunden als unbedenklich für die menschliche Gesundheit eingestuft wird. In diesen Richtlinien sind jedoch mögliche synergistische Effekte nicht berücksichtigt. In der Umwelt sind deutlich geringere Konzentrationen von Toluol und m-Xylol zu erwarten. Die Auswirkung dieser VOCs auf die Allergieentstehung ist noch weitestgehend unbekannt (Vollmert 2002). Diese Stoffe sind aufgrund ihrer Lipophilie stark hautpermeabel. Es wird vermutet, dass

diese Stoffe eine adjuvante Wirkung zur Allergieentstehung besitzen, der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt (Albright 1996). Auch in der Innenraumluft können flüchtige organische Substanzen in erhöhten Konzentrationen auftreten (Weisel 2002, Molhave 2003). Dessenwegen sind VOCs für die Allergieentstehung wichtig.

### *Partikel*

Partikel sind allgegenwärtig. Zu Millionen werden sie vom Menschen mit der Außen- und Innenraumluft eingeatmet. Als Schwebstaub bezeichnet man feste oder flüssige Schwebstoffe, die in Gasen suspendiert sind. Es werden folgende Definitionen verwendet (Kappos et al. 2003):

- Der Schwebstaub (total suspended particulates, TSP) ist die Aerosolkomponente der in der Luft vorhandenen Partikel bis zu einem oberen aerodynamischen Durchmesser von rund 30  $\mu\text{m}$ .
- Der thorakale Schwebstaub (thoracic particulates,  $\text{PM}_{10}$ ) umfasst Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von  $< 10 \mu\text{m}$
- Der aveolengängige Schwebstaub (respirable particulates  $\text{PM}_{2,5}$ ) umfasst Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser  $< 2,5 \mu\text{m}$  und wird auch als Feinstaub (FP) bezeichnet.
- Die ultrafeinen Partikel (UP) umfassen Teilchen  $< 0,1 \mu\text{m}$  aerodynamischen Durchmesser

Partikel werden sowohl aus natürlichen, wie auch aus anthropogenen Quellen freigesetzt. Der Verkehr ist als einer der bedeutendsten Emissionsquellen zu betrachten. Alle Fahrzeuge, aber vor allem Dieselfahrzeuge produzieren Partikel. Industriell entsteht Schwebstaub z.B. bei Feuerungsanlagen, Zementfabriken, bei der Kohleverarbeitung und der Metallproduktion und Verarbeitung. In den Innenräumen gelten vor allem Tabakrauch und Kochen als Emissionsquellen. Die Partikelgröße entscheidet wie weit Schwebstäube in den Atemtrakt vordringen können. Je kleiner die Partikel sind, desto tiefer gelangen sie in die Lunge. Teilchen, die kleiner als 10  $\mu\text{m}$  sind, können problemlos eingeatmet werden. Aber nur Feinstaubpartikel  $< 2,5 \mu\text{m}$  können bis in die Alveolen gelangen. Dort können sie nur langsam vom Immunsystem entfernt werden. Aufgrund der geringen Menge machen Feinstäube zwar nur weniger als 10% des Gesamtstaubes aus, aber 70-80% der Partikelzahl. Dessenwegen sollte ihre gesundheitliche Auswirkung

nicht unterschätzt werden. Besonders Feinstäube kleiner 2,5 µm haben in den letzten Jahren an öffentlichem Interesse gewonnen. Zur Bewertung des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes zur gesundheitlichen Wirkung von Partikeln in der Luft wird auf den Statusbericht Kappos et al. (2003) und insbesondere zu Dieselpartikeln auf Riedl et.al (2005) sowie Lemmen et al. (2004) hingewiesen.

## **1.8 Hintergrund zu molekularbiologischen Untersuchungen**

Molekularbiologische Methoden finden vielfältig Anwendung, dies reicht vom Studium der Gene und Proteine bis hin zur Analyse ihrer Funktion. Als Genom wird die Gesamtheit aller Gene im Organismus bezeichnet und ist statisch. Das Proteom ist die Gesamtheit der Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Organismus oder Organell vorliegen und ist demnach ein dynamischer Begriff. Speziell bei Allergenträgern ist wenig über ihr gesamtes Genom oder Proteom bekannt. Am intensivsten sind einzelne Allergene von unterschiedlichen Allergenträgern untersucht worden (Jahn-Schmid et al. 2003). Zur Aufklärung der Allergen-Sequenzen, ihrer Struktur, der Funktion und Wirkungsweise haben verschiedene molekularbiologische Methoden Anwendung gefunden (Stewart et al. 2001).

### *cDNA Mikroarrays*

Um gezielt nach unterschiedlich durch Stresseinfluss hochregulierten Genen zu suchen, eignet sich der Mikroarray besonders, da Tausende von Genen auf einmal analysiert werden können. Pflanzen können im allgemeinen auf abiotischen und biotischen Stress mit der Hochregulierung von Stressproteinen reagieren, die sie vor Schädigungen schützen (Chinnusamy et al. 2004, Roberts et al. 2002, Wasternack und Hause 2002). Nicht bekannt ist, ob die Methode auch auf Birkenpollen übertragbar ist. Bis jetzt ist kein Versuch bekannt, bei dem Genexpressionsanalysen mit allergenen Pflanzenarten bzw. deren Pollen mittels Mikroarray analysiert wurden. Dies liegt vor allem an den fehlenden Genomdaten bei diesen Organismen. Die Mikroarray-Methode ist jedoch ein ausgezeichnetes Screening-Verfahren. Besonders interessant ist die Erkennung von Gen-Mustern, d.h. werden mehrere an einem Stoffwechselweg beteiligte Gene gleichzeitig hochreguliert, so ist dies ein starker Hinweis dafür, dass unter den herrschenden

Bedingungen dieser Stoffwechselweg vermehrt aktiviert wurde. Generell limitiert ist diese Technologie unter anderem dadurch, dass keine zuverlässigen Aussagen gemacht werden können, ob das zu dem hochregulierten Gen gehörende Protein gleichermaßen hochreguliert ist. Auch können auf RNA-Ebene keine posttranskriptionale Modifikationen analysiert werden. Dazu müssen Proteomanalysen folgen.

### *Zweidimensionale Elektrophorese*

Die Technologie der 2D Elektrophorese gibt Aufschluss über die tatsächliche Proteinexpression in einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt. Der Einsatzbereich reicht von funktionellen bis hin zu komparativen Proteomanalysen. Auch posttranslationale Modifikationen können untersucht werden. Die Schlüsseltechnologie der modernen Proteomanalyse ist die zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) mit immobilisierten pH Gradienten (Görg 2000, 2004). Bei dieser hochauflösenden Methode werden, nach der Visualisierung, mehrere 1000 Protein-Spots in einem Gel sichtbar. Diese Methode nutzt zwei Eigenschaften für die Trennung der Proteine aus. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung der Proteine anhand von deren charakteristischen isoelektrischen Punkte. In der zweiten Dimension werden die Proteine anhand ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Die 2D Elektrophorese ist, kombiniert mit massenspektrometrischen Methoden und Datenbankanalysen, eine aussagekräftige Technologie zur Identifizierung von Proteinen. Je bessere Datenbanken der Öffentlichkeit zur Verfügung stehen, desto leichter ist die anschließende Protein-Identifizierung. Durch den Vergleich von theoretischen Spektrogrammen eines Proteins (möglich aus der veröffentlichten Proteinsequenz) mit denen mittels MALDI TOF Massenspektrometer erzielten Peptidmassenspektren, kann ein Proteinspot auf einem Gel identifiziert werden. Aber auch wenn das Genom des Organismus noch nicht beschrieben ist, kann mittels *de novo* Sequenzierung mit Elektrospray-Massenspektrometer/Massenspektrometer (ESI-MS/MS) und anschließendem Homologievergleich mit Proteinen aus nahverwandten Arten oder sehr konservierten und ubiquitären Proteinen, ein Protein identifiziert werden. Mehrere Genome, welche die Identifizierung vereinfachen, sind inzwischen veröffentlicht worden. Die Veröffentlichung des Genomes des Menschen hat 2001 für starkes Interesse der

Öffentlichkeit gesorgt (Venter et al. 2001). Die Datenbanken wachsen durch die Entwicklung von immer leistungsfähigeren Computern.

Bei Pollen ist die 2D Elektrophorese hauptsächlich zur Charakterisierung von Allergenen angewendet worden. Meistens wurde sie kombiniert mit Westernblots eingesetzt, um gezielt nach Allergenen zu suchen (Leduc-Brodard et al. 1994). So halfen zahlreiche Studien, die Birkenallergene zu beschreiben (Markovic-Housley et al. 2003). Durch die 1997 von Tonge beschriebene Technologie der „difference Gelelektrophorese“ (DIGE) wurde es möglich, die komparative Proteomanalyse aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Daten deutlich zu verbessern. Mit dieser Methode wurde es möglich geringe Expressionsunterschiede im Proteom zu analysieren. Zudem wurde die Linearität zu herkömmlichen Färbemethoden wie zum Beispiel Coomassie um ein Mehrfaches vergrößert. Jeder Fluophormarker (CyDye) bindet kovalent an die Epsilon-Aminogruppe von Lysin und verändert den isoelektrischen Punkt der Proteine nicht. Die DIGE Technologie ermöglicht es, durch diese unterschiedlich anregbaren Fluophormarker, mehr als nur eine Probe in einem Gel auftrennen zu können. Zusätzlich kann ein interner Standard in jedem Gel mitlaufen; dieser erleichtert und präzisiert die Auswertung der Gele. Anhand des Standards können die einzelnen Spots präzise übereinandergelegt (Matchen) und die Gel- zu Gel-Variationen ausgeglichen werden. Dabei hilft das extra für diese DIGE-Anwendung entwickelte Softwarepaket von der Firma Amersham Bioscience.

## 1.9 Fragestellung und Zielsetzung

Allergien sind zu verstehen als krankmachende Überempfindlichkeit gegenüber eigentlich harmlosen Substanzen (z.B. Gräserpollen) auf dem Boden einer spezifischen Änderung der Immunitätslage. Pollen von windbestäubenden Pflanzen gehören zu den häufigsten Allergenträgern. Eine positive Korrelation zwischen der Umweltbelastung und der ansteigenden Zahl von Allergikern konnte bereits in epidemiologischen Studien gezeigt werden. Hohes wissenschaftliches Interesse besteht darin, auch auf experimenteller Ebene einen Zusammenhang herstellen zu können. Hier liegt der Ansatzpunkt dieser Untersuchung. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob der beobachtete epidemiologische Zusammenhang zwischen der Umweltbelastung und der Zunahme von

allergischen Erkrankungen in Industriestaaten auch auf der Ebene der Allergenträger (Pollen) nachvollziehbar ist. Als These wird angenommen, dass Pollen durch Stress, ausgelöst durch Umweltbelastung, ihre Eigenschaften verändern und es dadurch zur Beeinflussung ihrer Allergenität bzw. zu negativen gesundheitlichen Auswirkungen kommen könnte.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- A. Können Pollen durch Wechselwirkungen mit verschiedenen Luftschadstoffen ihre Charakteristika verändern?  
Welche Umweltschadstoffe und Umweltbedingungen können dies in besonderem Maße bewirken?  
Unterscheiden sich Pollen von Landbäumen und Stadtbäumen im Hinblick auf ihre unterschiedliche Expositionslage auf molekularbiologischer und zellbiologischer Ebene?
- B. Haben Pollen aufgrund ihrer Expositionsgeschichte unterschiedlich starke Wirkungen auf Parameter der allergischen Entzündung und lässt sich diese Wirkung am Beispiel der chemotaktischen Wirkung auf humane neutrophile Granulozyten nachweisen?

Die Beantwortung der Fragen wird mit unterschiedlichen Ansätzen angegangen:

(1) *in vitro* und *in vivo* Expositionen

Je nach Fragestellung werden käufliche oder frisch gesammelte Pollen eingesetzt. Für eine gezielte Exposition von Pollen mit bestimmten Schadstoffen werden *in vitro* Expositionen im Wirbelschichtreaktor mit käuflich erworbenen Pollen durchgeführt. Frisch gesammelte Birkenpollen aus München (verkehrslageabhängig) werden gesammelt. Im einzelnen werden Birken, in der Nähe von Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU), Birken an stark verkehrsreichen Straßen im Zentrum von München und verkehrsexpositionsarme Birken im Landkreis Freising, in diese Untersuchung mitaufgenommen werden.

## (2) Pollen-Charakterisierung

Untersucht wird bei Pollen nicht nur der Gehalt an Allergenen, als Hauptauslöser für allergische Reaktionen beschriebene Proteine, sondern auch proinflammatorisch und immunmodulatorisch wirkende Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs) sowie Antioxidantien. Letztere werden aufgrund ihrer Radikalfängereigenschaften bei oxidativem Stress gebildet. Der Gehalt dieser Substanzen soll bei verschiedenen Pollenarten bestimmt und zu allergierelevanten Parametern korreliert werden.

## (3) Nachweis von Lipoxygenase in Pollen

Das Enzym Lipoxygenase, ein ca. 100 kDa Protein, welches Linol- und Linolensäuren zu monohydroxylierten Produkten umwandelt, ist von speziellem Interesse, da es den Stoffwechselweg zur Produktion von PALMs einleitet. Es soll mittels Westernblot überprüft werden, ob dieses Enzym auch in Pollen vorhanden ist, oder ob PALMs ausschließlich auf autooxidativem Wege gebildet wird.

## (4) 2D Elektrophorese

Das Proteom der Pollen wird untersucht. Dazu sollen Pollenextrakte von vier Stadtbirken aus dem Stadtinneren von München und Pollenextrakte von vier Landbirken quantitativ verglichen werden. Die Bestimmung der relativen quantitativen Proteinexpression erfolgt mittels der sensitiven "Difference Gelelektrophorese" (DIGE) Technologie. Die Computer-unterstützte Analyse mit den DeCyder (Amersham Biosciences™) Computerprogrammen ermöglicht die Auswertung.

Unterschiedlich hoch regulierte Proteine zwischen den Stadt- und Landpollen sollen dann mittels *de novo* Sequenzierung analysiert und hinsichtlich Proteinsequenzhomologien verglichen werden. Auf diese Weise soll es möglich sein, diese Proteine eindeutig identifizieren zu können.

## (5) Stressprotein-Microarray

Als weiteres Screening-Verfahren zur Untersuchung unterschiedlich exponierter Pollen soll ein ursprünglich für *Arabidopsis*-Stressgene entwickelter Mikroarray eingesetzt werden, um stressrelevante Gene in Pollen identifizieren zu können.

Diese experimentellen Ansätze sollen dazu beitragen, den Zusammenhang von Allergiezunahme und Umweltbelastung auf der Ebene der Allergenträger aufzudecken.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Aceton	Merck	Darmstadt, Deutschland
Acrylamid, Bisacrylamid	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Biorad	München, Deutschland
Agarose	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aktivkohleröhrchen NIOSH	Dräger	Lübeck, Deutschland
Albumin	Pierce	Rockford, USA
Albumin Standard	Pierce	Rockford, USA
Albumine bovine	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase konjugierter	Jakson Immuno	Hamburg, Deutschland
Affini Pure Goat Anti-Rabbit IgG	Research Laboratories	
Amberlite MB-1 Ionenaustauscher	Serva	Heidelberg, Deutschland
6-Aminocaprinsäure	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ammoniumacetat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumbicarbonat	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Serva	Heidelberg, Deutschland
Bet v 1 Standard	Allergopharma	Reinbek, Deutschland
Biotinylierter Detektions-Antikörper	Allergopharma	Reinbek, Deutschland
5-Bromo-4-Chloro-3-Inolyl-Phosphat	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt, Deutschland
CHAPS	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R-250	Serva	Heidelberg, Deutschland
Coomassie-	Pierce	Rockford, USA
Proteinbestimmungsreagenz		
Cy Dyes	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
D,L-Dithiothretiol (DTT)	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Eisessig	Merck	Darmstadt, Deutschland

Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung (37%)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Glycin	Serva	Heidelberg, Deutschland
Glyzerin (100%), Harnstoff	Merck Amersham Biosciences	Darmstadt, Deutschland Uppsala, Schweden
Histopaque-1077	Sigma Diagnostics	St. Louis, USA
Histopaque-1119	Sigma Diagnostics	St. Louis, USA
IPG-Streifen	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Jodacetamid	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kerosin	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Leukotrien B <sub>4</sub> Enzymimmunoassay (EIA) System	Amersham Biosciences, UK Limited	Buckinghamshire, UK
L-Glutamin	PAA	Linz, Österreich
Lysin	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Monoklonaler Coating-Antikörper	Allergopharma	Reinbek, Deutschland
m-Xylol	Merck	Darmstadt, Deutschland
N-1-Naphtyletylendiamindihydrochlorid	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Natriumnitrit	Fluka	Buchs, Schweiz
Natriumthiosulfat	Merck	Darmstadt, Deutschland
PBS	PAA	Linz Österreich
Pentamycin-Streptomycin	PAA	Linz Österreich
Pharmalyte, pH 3-10	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden

Phenol	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Phosphorsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Prostaglandin E2 Biotrak	Amersham	Buckinghamshire, UK
Enzymimmunoassay (EIA) System	Biosciences, UK Limited	
RPMI Medium 1640	Gibco	Steinheim, Deutschland
Salpetersäure (65%)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
SDS Sodiumdodecylsulfat	Serva	Heidelberg, Deutschland
SDS-PAGE Standard low range	Bio-Rad	München, Deutschland
Silbernitrat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Silikonöl	Serva	Heidelberg, Deutschland
Streptavidin-Peroxidase	Sigma	Steinheim, Deutschland
Sulfanilamid	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Thioharnstoff	Merck	Darmstadt, Deutschland
TMB-Fertiglösung	Sigma	Steinheim, Deutschland
Toluol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Triethanolamin	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris-Borate-EDTA (TBE)	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tween 20	Merck	Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Geräte

Aerosolgenerator	Patentnr. DE 199 47 597 C1 vom 4.1.01	München, Deutschland
Biofuge Pico	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Dy Strip Kit	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Elektrophoresekammern	Phase	Lübeck, Deutschland
Ettan Dalt	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
FACSCalibur	Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland

---

Feinwaage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Flachbrettscanner Epson Exression Pro	Epson	Hong Kong, China
Gaschromatograph Autosystem XL	Perkin Elmer	Wellesley, USA
Gasflussregler Messeinheit	MKS	München, Deutschland
Gasflussregler Steuereinheit	MKS	München, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage	Christ	Ostrode, Deutschland
GEL DOC System	Biorad	München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Bio Rad	München, Deutschland
Glasplatten	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Hygrometer	Dostmann electronic	Wertheim, Deutschland
Kippschüttler	GFL	Burgwedel, Deutschland
Kühlwasserbad	Haake	Karlsruhe, Deutschland
Lichtmikroskop	Leitz-Leica	Wetzlar, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Mikrotiterplattenschüttler KS 125	IKA Labortechnik	Staufen, Deutschland
Multiphore II	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Multitemp II Kryostat	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Netzgerät	Heinzinger	Rosenheim, Deutschland
Pegasus Semi-Dry-Blotter	Phase	Lübeck, Deutschland
pH-Meter	WTW	Weihlheim, Deutschland
Quellkassette	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Revelation MRX TC (ELISA- READER)	Thermo	Engelsbach, Deutschland
Spectralphotometer DU 640	Beckmann	Fullerton, USA
Thermocycler: PCR Express	Thermo Life Science	Egelsbach, Deutschland
Typhoon Phosphor Imager	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Ultraschallstab	Bandelin	Berlin, Deutschland
VOC-Generator	Patentnr. DE 199 47 609 C1 vom 3.5.01	München, Deutschland

---

Vortexer	Bender & Hobein	Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Wirbelschichtreaktoren	Patentnr. DE 199 47 681 C1 vom 27.9.01	München, Deutschland

### 2.3 Sonstiges

1st Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	Penzberg, Deutschland
2D Quant Kit	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
BCA Protein Assay Kit	Uptima	Montlucon Cedex, Frankreich
BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro- 3-indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium Tablets)	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Exel-Gel	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Gasflaschen	Linde	Höllriegelskreuth, Deutschland
GEL Blotting Papier	Schleicher und Schüll	Dassel, Deutschland
Greiner Röhrchen	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
IPG-Streifen	Amersham Biosciences	Uppsala, Schweden
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll	Dassel, Deutschland
Rneasy Plant Mini Kit	Quiagen	Hilden, Deutschland
Sterilfilter	Millipore	Echborn, Deutschland
Transwell-Platten	Costar	Corning, USA
Urban dust, NST 1648	National Institute of Standards & Technology	Gaithersburg, USA

### Pollen

<i>Alnus incana</i> -Pollen Batch 012497101	Allergon	Ängelholm, Schweden
<i>Artemisia vulgaris</i> -Pollen Batch 010194102	Allergon	Ängelholm, Schweden

---

<i>Betula verrucosa</i> -Pollen Batch	Allergon	Ängelholm, Schweden
012500101		
<i>Corylus avellan</i> -Pollen Batch	Allergon	Ängelholm, Schweden
012798101		
<i>Phleum pratense</i> -Pollen Batch	Allergon	Ängelholm, Schweden
011301901		
<i>Pinus sylvestris</i> -Pollen Batch	Allergon	Ängelholm, Schweden
013897101		

### 3 Methoden

#### 3.1 *In vitro* Expositionen von Pollen im Wirbelschichtreaktor

Für die *in vitro* Expositionen der Pollen standen zwei Wirbelschichtreaktoren zur Verfügung (siehe Abbildung 3.1.1). Diese wurden von Fritsche et al. (1997) entwickelt (Patentnummer DE 199 47 681 C1 vom 27.9.01), um die Exposition von Pollen mit Luftschadstoffen während des Lufttransportes zu simulieren. Durch Zufuhr von Luftschadstoffen, hier Schwefeldioxid, Partikel oder flüchtige organische Substanzen, durch einen Einstromkanal wurde gezielt der Einfluss von Schadstoffen auf die Pollen untersucht. Die gewählten Versuchsparameter sind in Tabelle 3.1.1 aufgelistet. Ein Wirbelschichtreaktor wurde als Kontrolle mit synthetischer Luft betrieben, während in dem anderen Wirbelschichtgenerator die speziellen Schadstoffbedingungen eingestellt waren. Bei den durchgeführten Versuchen war es wichtig, dass die Pollen während der gesamten Exposition im luftgetragenen Zustand blieben, dass heißt eine sogenannte Pollen-Wirbelschicht sich ausbildete.

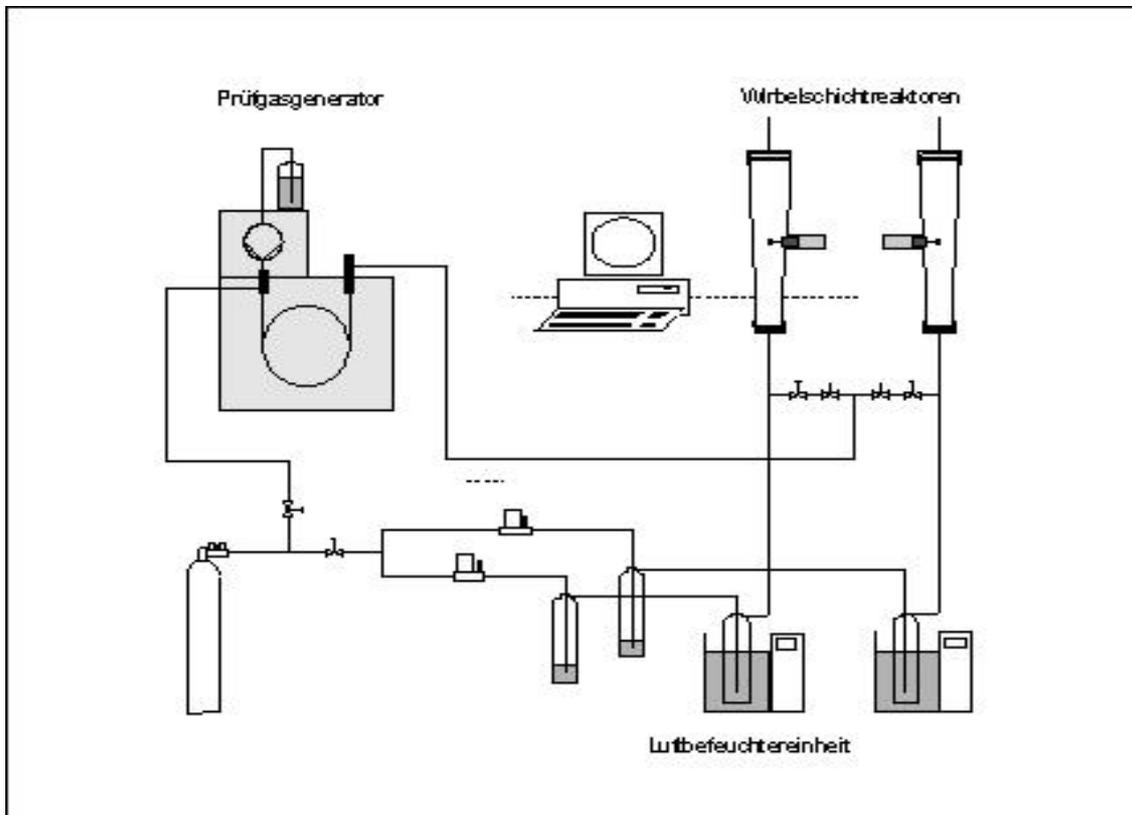


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung der Wirbelschichtanlage (Risse et al. 2000)

---

Die Wirbelschichtreaktoren sind zu diesem Zweck nach oben hin verbreitert, so dass die Geschwindigkeit des Luftstromes mit zunehmender Höhe abnimmt. Dadurch kommt es im oberen Teil des Reaktors zur Sedimentation der Pollen. Die Stärke des dafür einzublasenden Luftstromes hängt von den Flugeigenschaften der Pollenarten ab und wurde auf 1000ml/min eingestellt. Um zu vermeiden, dass sich ein Luftstromkanal in der Wirbelschicht bildete, wurden Intervallgeber eingesetzt, die kontinuierlich gegen die Reaktoren schlugen und so eine Luftverwirbelung gewährleisteten. Mit einem „Seifenblasenmessgerät“ wurde die Stärke des Luftstromes im Wirbelschichtreaktor vor den Versuchen kontrolliert. Hierzu wurde ein, unten an einem Glasrohr befindlicher Gummiball, mit 5% Seifenlauge befüllt. Durch Pumpen des Balles bildeten sich Seifenringe im Glasrohr aus. Beim Durchleiten des Luftstromes durch das Glasrohr stiegen die Seifenringe nach oben. Der Volumenstrom wurde durch Stoppen der Zeit, in der der Seifenring ein bestimmtes Volumen zurücklegte, bestimmt. Zur Stabilisierung der Luftfeuchte (30%, 50%, 70%) wurde über mehrere Stunden vor dem Versuch die Luftfeuchte wie folgt eingestellt: Die synthetische Luft wurde zunächst durch destilliertes Wasser geleitet, um eine 100%ige Sättigung zu erreichen. Anschließend wurde die Luft durch eine mittels Wasserbad temperierte Schottflasche geleitet. Je nach eingestellter Temperatur konnte durch Auskondensation der Feuchte in der Luft die gewünschte relative Luftfeuchte eingestellt werden. Für die Exposition wurden durch die obere Öffnung je 2 g Pollen in die Wirbelschichtreaktoren gegeben. Nach der Verweildauer (4 h, 6 h oder 16 h) der Pollen in der Luft im Wirbelschichtreaktor wurde der Versuch gestoppt. Die Pollen wurden in gasdichten Gefäßen aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für die weiteren Analysen eingefroren.

Tabelle 3.1.1: *In vitro* Expositionsbedingungen von Pollen im Wirbelschichtreaktor.

Pollenart (*)	synthetische Luft angereichert mit (+)	Relative Luftfeuchte %rF	Luftstrom	Dauer
<i>Betula verrucosa</i>	Schwefeldioxid 13 mg/m <sup>3</sup>	30, 50, 70,	1000 ml/min	16 h
<i>Betula verrucosa</i>	Schwefeldioxid 13 mg/m <sup>3</sup>	30, 50, 70,	1000 ml/min	16 h
<i>Betula verrucosa</i>	Partikel NST 1648 Ø 3 µm, 200 µg/m <sup>3</sup>	50	1000 ml/min und 500 ml/min über Partikelgenerator	4 h
<i>Phleum pratense</i>	Partikel NST 1648 Ø 3 µm, 200 µg/m <sup>3</sup>	50	1=00 ml/min und 500 ml/min über Partikelgenerator	6 h
<i>Phleum pratense</i>	Toluol/m-Xylol Im Verhältnis 3:2, 1MAK (bezogen auf Toluol)	50	1000 ml/min	6 h

(\*) 2 g Pollen pro Wirbelschichtreaktor

(+) als Kontrolle wurde reine synthetische Luft mit einem Luftstrom von 1000 ml/min verwendet.

### *Schwefeldioxid*

Für die Expositionen der Pollen mit Schwefeldioxid wurde eine Gasflasche mit 125ppm Schwefeldioxid der Firma Siad (Gmunden, Österreich) an den Wirbelschichtreaktor angeschlossen. Die gewünschte Konzentration von 13mg/ m<sup>3</sup> Schwefeldioxid (entspricht 10 MAK) im Wirbelschichtreaktor wurde über einen Druckregler eingestellt.

### *Ultrafeine Partikel*

Ein von Risse (2000) entwickelter Aerosolgenerator (Patentnummer DE 199 47 597 C1 vom 4.1.01) wurde für die Exposition mit Feinpartikeln verwendet. Das Herzstück dieses Generators ist eine Membran, die durch Schallwellen zum Schwingen gebracht wird. Dadurch kommt es zur Zerstäubung der Partikel, die während der Exposition in den Wirbelschichtreaktor überführt werden. Bei den mit dieser Apparatur durchgeführten Versuche musste darauf geachtet werden, dass die Membran nicht übermäßig beansprucht wurde, um Membranrisse zu vermeiden. Die Schwingungseigenschaften der Membran wurde über eine Videokamera im Generator überprüft und die Einstellungen am Schallgeber dementsprechend adjustiert. Als optimale Versuchsbedingungen wurden folgende Einstellungen ermittelt: Frequenz 1,4, 170 Hz ; Amplitude maximal, Sinuswellen,

„offset“ Null. Bei zu hohem Ausblaswiderstand durch den am Ausgang befindlichen Filter in der Fritte konnte ein Gegendruck entstehen. Dies musste vor dem Versuch ausgeschlossen werden.

Ein an den Wirbelschichtreaktor angeschlossener Partikel-Generator zeigte die Verteilung der Partikelgröße und die Konzentration an. Alle zwei Stunden wurden 150 mg „Urban dust 1648“ während der Exposition nachgefüllt.

#### *Flüchtige organische Substanzen (VOCs)*

Ein Gemisch aus 3:2 Toluol/m-Xylol wurde im VOC-Generator (Patentnummer DE 199 47 609 C1 vom 3.5.01) generiert. Die Konzentration der Bestandteile wurde im Gaschromatographen bestimmt und mit dem Druckregler am VOC-Generator - auf 1 MAK bezogen auf Toluol - nachjustiert. Dazu wurde zuerst eine *Online*-Überwachung des Gasgemisches etabliert. Für die *Online*-Überwachung des Experiments wurden 100 µl Gas kontinuierlich entnommen und im Gaschromatographen analysiert. Es wurden die in Tabelle 3.1.3 angegebenen Einstellungen zur Gas-Analyse benutzt. Der Vorteil der Online-Überwachung lag darin, einen guten Überblick über die sich einstellende VOC-Konzentration zu erhalten, um schnell Regulationen am VOC-Generator vornehmen zu können. Die tatsächlichen Versuchskonzentrationen wurden mittels Toluol- und m-Xylol-Standardkurven ermittelt. Während des Versuches wurden drei Gasproben in Drägerröhrchen/Aktivkohleröhrchen gesammelt. Die Probenentnahmezeit umfasste 20 min, 30 min und 45 min, wobei die Pumpe zur Probenentnahme auf 90 ml/min eingestellt war. Die gesamte Aktivkohle mit den adsorbierten Proben bzw. Standards wurde einzeln in 2 ml Benzylalkohol gegeben, das als Desorptionsmittel für das VOC-Gemisch benutzt wurde. Dazu wurden die Röhrchen mit einem Glasschneider halbiert und der Inhalt verlustfrei in einem Gefäß aufgefangen, das anschließend gasdicht verschlossen wurde. Die Gefäße wurden über Nacht geschüttelt und die Flüssigkeit mittels den in Tabelle 3.1.2 aufgeführten Einstellungen am Gaschromatographen analysiert.

Tabelle 3.1.2: Messverfahren im Gaschromatographen mittels gasdichter Spritze für die *Online*-Überwachung.

Injektor	250°C, Split 1:5
Flammenionisationsdetektor (FID)	250°C
Ofenprogramm	100°C isotherm
Injektion (manuell)	100 µl
Trennsäule	PE-1

Tabelle 3.1.3: Messverfahren im Gaschromatographen mit Probenentnahme mittels Drägerröhrchen.

Injektor	250°C Split 1:20
Flammenionisationsdetektor (FID)	250°C
Ofenprogramm	100°C für 8 min, mit 40°C/min auf 220°C, 220°C für 4min
Injektion (Autosampler)	1 µl der in Benzylalkohol desorbierten Analyten
Trennsäule	PE-1

### 3.2 Birkenpollen-Sammlung

Die Birken, von denen die Pollen gewonnen wurden, sind eingegliedert in eine interdisziplinäre Studie. Diese erweiterte „German Infant Nutrition Programm Studie (GINI PLUS Studie)“ läuft seit mehreren Jahren und hat unter anderem das Ziel, regionale Unterschiede der Polleninhaltsstoffe z.B. zwischen Nord- und Süddeutschland aufzudecken. In der vorliegenden Doktorarbeit sollten Unterschiede aufgrund von verschieden starker Verkehrsbelastung der Bäume bzw. deren Pollen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden aus der GINI PLUS Studie gezielt Birken in und um München, je nach Expositionslage, ausgewählt (siehe Tabelle 3.2.1). Um die Umweltbelastung der Bäume gut einschätzen zu können, wurden Bäume gewählt, die in der Nähe von Umweltmessstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU) stehen. Im Jahr 2003 wurden fünf Landbirken im Landkreis Freising mit in die Studie aufgenommen.

Tabelle 3.2.1: Sammeljahr und Standorte der Birken, von denen Pollen gesammelt wurden. Die Umweltdaten wurden durch eigene Messung von Stickstoffdioxid oder den Messdaten der Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU) entnommen.

Standortnummer GINI PLUS	Standort	Sammeljahr	Umweltdaten 2002/2003
5	Heckenstallerstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid
15	Weinbergerstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid (nur 2002)
22	Ungererstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid
32	Drygalskiallee	2002/2003	Stickstoffdioxid
33	Mozartstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid
I	Johanneskirchen	2002/2003	Messstation LfU
II	Dachauerstraße	2002/2003	Messstation LfU
III	Westendstraße	2002/2003	Messstation LfU
IV	Luise-Kiesselbach Platz	2002/2003	Messstation LfU
V1	Landsbergerstraße	2003	Messstation LfU
V2	Landsbergerstraße	2003	Messstation LfU
100	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid
101	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid
102	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid
103	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid
104	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid

Die Sammlung der Pollen erfolgte an einem Tag mit sehr hohem Pollenflug im April (Appendix). Mindestens 50 Birkenkätzchen wurden gesammelt. Die Pollen wurden anschließend für einen Tag im Gewächshaus unter standardisierten Bedingungen getrocknet. Um die Pollen von dem Kätzchen zu trennen, wurden die Proben erst vorsichtig durch ein 100 µm Sieb und anschließend durch ein 72 µm Sieb geschüttelt. Danach wurde die Probe aliquotiert und für die weiteren Analysen bei -80°C eingefroren.

### 3.3 Standortcharakterisierung der Birken

Die Abschätzung der Umweltbelastung der Birkenstandorte erfolgte durch Bestimmung verschiedener Parameter. Zum einen wurden in Fragebögen Einflussfaktoren abgefragt (siehe Punkt 3.3.1 und Appendix). Die Standortcharakterisierung im Hinblick auf die Umweltschadstoffe direkt am Baum erfolgte entweder mittels NO<sub>2</sub>-Passivsammler oder wurden durch Messungen des Landesamtes für Umweltschutz erfasst (siehe Punkt 3.3.2 und Appendix).

#### 3.3.1 Fragebögen zur Standortcharakterisierung der Birken

Für die Standortcharakterisierung wurde ein Fragebogen entwickelt, der sowohl biologische Aspekte, wie z.B. Höhe des Baumes, die Himmelsrichtung der Pollensammlung, als auch abiotische Faktoren wie z.B. Temperatur und relative Luftfeuchte während der Sammlung beinhaltet. Besonders wichtig waren die Kategorien 6-9 des Fragebogens (siehe Appendix), anhand derer eine Abschätzung der Verkehrsbelastung vorgenommen wurde. Hierzu wurde ein Verkehrs-Score erstellt. Je kleiner der Score desto geringer die Verkehrsbelastung. Die vier Einfluss-Kategorien beinhalteten:

1. Straßencharakteristik (Kategorie 6 des Fragebogens): Steht der Baum in einer

- Wiese/Feld	0 Punkte
- Nebenstraße mit Tempolimit 30	1 Punkt
- Nebenstraße ohne Tempolimit 30	2 Punkte
- Hauptstraße	3 Punkte

2. Verkehrssituation(Kategorie 7 des Fragebogens):

Anwohnerverkehr	1 Punkt
Durchgangsverkehr	2 Punkte
Berufsverkehr	3 Punkte

3. Verkehrslage (Kategorie 8 des Fragebogens): Entfernung vom Baum zur nächsten Straße

= 10 m	3 Punkte
> 10 m bis = 20 m	2 Punkte
> 20 m	1 Punkt

4. Verkehrslage (Kategorie 9 des Fragebogens): Entfernung vom Baum zu einer verkehrsreichen Hauptstraße

= 10 m	3 Punkte
> 10 m bis = 50 m	2 Punkte
> 50 m bis 150 m	1 Punkt
= 150 m	0 Punkte

Die Summe der erreichten Punkte für einen Standort ergab den Verkehrs-Score. Der maximale Score für einen Standort war die Punktzahl 12 und spiegelt die höchste Verkehrsbelastung wider. Durch eine Skala von 1-12 Punkte wurde die Verkehrsbelastung des Standortes eingeschätzt.

### 3.3.2 NO<sub>2</sub>-Bestimmung als Indikator für Verkehrsbelastung

Die Stickstoffdioxidbestimmung erfolgte mittels Passivsammler direkt am Baum. Pro Baum wurden zwei Passivsammler (Plexiglasröhrchen) vorbereitet. Hierzu wurden pro Passivsammler drei Edelstahlnetze (40 Maschen/inch, 11 mm Durchmesser) für 10 Sekunden in eine Triethanolamin-Lösung getaucht (1:7) und anschließend für 10 Minuten Luft getrocknet. Je drei beschichtete Edelstahlnetze wurden in eine Verschlusskappe gegeben und auf einen Passivsammler gesteckt. Mit einer zweiten Verschlusskappe wurde der Passivsammler luftdicht verschlossen. Zwei Röhrchen wurden in eine Aufhängedose gegeben, die in zwei bis drei Meter Höhe am Baum befestigt wurde. Beim Start der Stickstoffdioxid Messung wurde die untere Verschlusskappe geöffnet und der Zeitraum, ab dem die Luft in die Röhrchen strömen konnte, auf die Minute genau notiert. Stickstoffdioxid bindet an die beschichteten Edelstahlnetze durch Ausbildung eines Triethanoldiamin-NO<sub>2</sub> Komplexes. Nach einem einwöchigen

Expositionszeitraum wurden die Passivsammler wieder verschlossen und eingesammelt. Das Ende der Messung wurde ebenfalls Minuten genau notiert. Für die Analyse der Röhrchen im Labor wurden Wasser und zwei Reagenzien im Verhältnis 1:1:0,1 vermischt, (Reagenz 1: 2 g Sulfanilamid in 5 ml Phosphorsäure gelöst und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt, Reagenz 2: 70 mg N-1-Naphtylendiamindihydrochlorid in 50 ml bidestilliertem Wasser gelöst). Die drei Edelstahlnetze pro Passivsammler wurden in 2,1 ml dieser Lösung für 30 Minuten geschüttelt. Die Extinktion wurde in einem Beckmann Photometer bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Für die Auswertung der Analyseergebnisse wurde eine Standardkurve mit 0-50 nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> erstellt. Durch Kontrollröhrchen wurde, das bereits bei der Röhrchenvorbereitung adsorbiertes Stickstoffdioxid abgezogen.

Die Konzentrationsrechnung des im Passivsammler gebundenen Stickstoffdioxids erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$C = (Q \times Z \times M \times 1000) / (D \times A \times T)$  in der folgende Parameter berücksichtigt waren;

C: NO<sub>2</sub> in µg/m<sup>3</sup>

Q: adsorbiertes NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in nmol

Z: Diffusionsweg 7,5 cm

M: Molgewicht 46

D: Diffusionsquotient Stickstoffdioxid 0,154 cm<sup>2</sup>/s

A: Diffusionsquerschnitt 0,785 cm<sup>2</sup>

T: Expositionszeit in Sekunden

### 3.3.3 Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU)

Das Bundesamt für Umweltschutz misst regelmäßig an festen Umweltstationen verschiedene Umweltparameter. Von vier bzw. ab 2003 sechs Bäumen wurden Pollen in der Nähe dieser Stationen gesammelt. So konnte von einer guten Korrelation mit den in den Stationen gemessenen Parameter ausgegangen werden (siehe Tabelle 3.3.1).

Tabelle 3.3.1: Schadstoffmessungen an den Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU-Messstationen), um die Exposition der Birken zu charakterisieren: Standortnummerierung und gemessene Umweltparameter.

Standort	LfU-Messtation	Baumnr.	Umwelt-Parameter
Johanneskirchen	L8.12	I	NO, NO <sub>2</sub> , CO, Feinstaub (PM10), O <sub>3</sub> , SO <sub>2</sub>
Moosach/Dachauerstraße	L8.7	II	NO, NO <sub>2</sub> , CO, Feinstaub (PM10), SO <sub>2</sub>
Westendstraße	L8.9	III	NO, NO <sub>2</sub> , CO
Luise-Kiesselbach Platz	L8.11	IV	NO, NO <sub>2</sub> , CO, Feinstaub (PM10), SO <sub>2</sub>
Pasing/Landsbergerstraße	L8.4	V1, V2	NO, NO <sub>2</sub> , CO, Feinstaub (PM10)

Die Korrelationen der Pollencharakteristika zu der Umweltbelastung erfolgte jeweils mit dem Mittelwert der LfU-Messdaten (vom Mai des Vorjahres bis Ende April des Jahres, in dem die Pollen gesammelt wurden). Dadurch wurde der gesamte Einfluss der Schadstoffe auf den Baum, auf die Entwicklung der Birkenkätzchen und die Pollenreifung bis zur Pollensammlung berücksichtigt.

### 3.4 Pollenextrakt-Herstellung

Zur Charakterisierung der Pollen wurden wässrige Pollenextrakte hergestellt. Vier unterschiedliche Pollenextrakte, jeweils mit optimierten Bedingungen für die einzelnen Tests, wurden vermessen. Pro Standort wurden drei unabhängige Probenextrakte hergestellt.

#### *Ammoniumbicarbonatextrakt*

Je 15 mg Pollen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen eingewogen, 5 min bei 1200xg zentrifugiert und anschließend in 3 ml Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 8,14) aufgenommen. Die Suspension wurde eine Minute gevortext und anschließend für 4 h bei RT im Dunkeln überkopf geschüttelt. Der Extrakt wurde in 2 ml Eppendorfgefäßen umgefüllt und 10 min bei 17000xg zentrifugiert. Der

wässrige Extrakt wurde aliquotiert und je nach weiterer Analyse entweder bei minus 80°C eingefroren (Bestimmung LTB<sub>4</sub>- und PGE<sub>2</sub>- ähnlichen Substanzen) oder lyophilisiert (Bet v 1 Bestimmung). Zum Lyophilisieren wurde 0,1% BSA zur Probe gegeben. Die Probe wurde anschließend gevortext, abzentrifugiert und mindestens für 30 min bei -80°C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Bis zur Bet v 1-Bestimmung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

#### *RPMI Mediumextrakt*

Um in den Funktionsassays optimierte Bedingungen für die Zellen zu schaffen, wurde unmittelbar vor den Versuchen der Pollenextrakt direkt im Zell-Medium erstellt. Dazu wurden 10 mg Birkenpollen in 1 ml RPMI Medium für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit den Konzentrationen von 1, 3 und 10 mg Pollen/ml Medium.

#### *Sodiumdodecyl-(SDS)-Extrakt*

Zum Nachweis des Enzymes Lipoxygenase im Pollenextrakt wurde ein SDS-Extrakt hergestellt. Je 20 mg Pollen (*Pleum pratense*, *Betula verrucosa* der Firma Allergon, Uppsala, Schweden) wurden für 15 min mit Trockeneis gemörsert. Die gemörserten Pollen wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt. Nach Zugabe von 300 µl mit kaltem Tris gesättigtem Phenol mit 5% Mercaptoethanol wurde der Extrakt in ein 2 ml Eppendorfgefäß umgefüllt. Der Extrakt wurde dann im Schüttler für 15 min bei 4°C langsam geschüttelt. Anschließend wurde der Extrakt bei 5100xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere und die Inter-Phase wurden vorsichtig abgenommen, verworfen und zur unteren Phase 300 µl Tris, pH 8,0, Phenol gesättigter Puffer mit 5% Mercaptoethanol zugegeben (2x). Danach wurde die untere Phase ohne Pellet mit 1200µl, 4°C kaltem Ammoniumacetat (in Methanol) vermischt. Die Proteine fielen bei -80°C innerhalb einer Stunde aus. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C mit 15300xg entstand ein Proteinpellet. Die Reinigung des Pellets erfolgte durch fünfmaliges Waschen mit 40 mM Ammoniumacetatpuffer. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 10 min getrocknet. Das Pellet wurde mit 50 µl Tris (2%SDS pH 6,8) über Nacht im Kühlschrank gelöst und anschließend wurde der Extrakt bei -80°C für weitere Analysen eingefroren.

### *PBS-Extrakt*

Zur Herstellung von PBS-Extrakten wurden je 10 mg Pollen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen abgewogen, 1 ml PBS zugegeben, 30 Sekunden gevortext und der Extrakt bei 37°C für 30 min inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Pollen alle 10 min gevortext. Anschließend wurde der Extrakt bei 400xg abzentrifugiert. Mit einer Einwegspritze wurde der Überstand vom Pellet getrennt und für die Bestimmung des antioxidativen Potentials bei -80°C eingefroren.

## **3.5 Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Polleninhaltsstoffen im Extrakt**

### **3.5.1 Proteinbestimmung**

#### *Proteinbestimmung nach Bradford*

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem Prinzip von Bradford (1976). Von jedem Standort wurden drei Extrakte hergestellt und je 100 µl der jeweiligen Ammoniumbicarbonat- und RPMI- Extrakte bzw. des Albumin Standards wurden in die Wells der 96 Mikrotiterplatte pipettiert. Als Blank dienten die jeweiligen Extrakt-puffer. 100 µl Coomassie-Reagenz wurden für 30 Sekunden mit der Probe auf einem Schüttler vermischt. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im MRX TC Revalation Mikrotiterplatten Reader von Thermo gemessen. Es konnte ein Konzentrationsbereich von 2,5 µg - 60 µg Protein pro einem Milliliter Extrakt in diesem Mikrotiterprotokoll bestimmt werden. Jeder Extrakt wurde in einer Doppelbestimmung gemessen.

#### *Proteinbestimmung mittels BCA-Test (bicinchoninic acid-Test)*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den SDS-haltigen Extrakten, die für den Lipoxygenasenachweis hergestellt wurden (siehe Punkt 3.7), erfolgte mittels BCA-Test der Firma Uptima (Montlucon Cedex, Frankreich) nach Smith et al. (1985). Die Methode beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis eines Bicinchoninsäure/Cu<sup>+</sup>-Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu<sup>2+</sup>-Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht (Smith et al. 1985). Eine Bestimmung mit dem Coomassie-Reagenz ist nicht möglich, da es zu Interferenzen mit dem SDS-Extrakt kommt. Die

Proteinkonzentration wurde im Bereich von 2 µg – 2 mg mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Die Messung erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben. In einzelnen wurden 10 µl von jedem Standard und jeder Probe in Wells pipettiert und mit 200 µl des BCA-Reagenz (Reagenz A:B in 50:1) versehen. Bei 37°C erfolgte die Inkubation der Platte für 30 min. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde im Bereich von 2 µg – 2 mg mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt. Alle Proben wurden in mehreren Verdünnungsstufen in einer Doppelbestimmung analysiert und so die Proteinkonzentration bestimmt.

### **3.5.2 Bet v 1- Bestimmung mittels ELISA**

Die Bet v 1 Bestimmung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Toxikologie des ZAUM - Zentrum Allergie und Umwelt. Pro Standort wurden drei unabhängige Proben im Doppelansatz vermessen. Hierbei wurde in jedes Well einer Mikrotiterplatte 100 µl Coating-Antikörper (1:10) pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit Waschpuffer. 100 µl Probe bzw. Standards wurden im Doppelansatz für eine Stunde in der Mikrotiterplatte unter Schütteln bei RT inkubiert und danach durch dreimaliges Waschen die überschüssigen Substanzen entfernt. Der Überschuss des danach zugegebenen 100 µl biotinylierten Zweit-Antikörpers (1:6000, 1 Stunde) wurde ebenfalls durch dreimaliges Waschen entfernt. Danach wurde 100 µl Streptavidin-Peroxidase (1:16000) zugesetzt (30 min, im Dunkeln). Anschließend wurden 100 µl TMB-Substrat umgesetzt, wobei dieser Vorgang dann mit Stopplösung nach 10 min abgestoppt wurde. Die Auswertung erfolgte mittels Standardkurve (Albumin) im MRX TC Revalation Mikrotiterplatten Reader der Firma Thermo (Engelsbach, Deutschland) mit der Wellenlänge 492 nm. Zur Auswertung wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Zu Vergleichszwecken wurde die Bet v 1-Konzentration auf 10 mg Pollen berechnet.

*Coatingpuffer (100 ml, pH 9,6)*

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,17 g
Na HCO <sub>3</sub>	0,286 g

*Waschpuffer 20 x PBS (500 ml, konzentrierte Stammlösung)*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	24,25 g
KCl	112,0 g

Puffer 1:200 mit Aqua dest. verdünnen und 0,5 ml Tween 20 zugeben

*Stopplösung*

Schwefelsäure	1 N
---------------	-----

### 3.5.3 Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs)

#### **PALMs mit proinflammatorischer Wirkung - LTB<sub>4</sub>-ähnliche Substanzen**

Für die Bestimmung der LTB<sub>4</sub>-ähnlichen Substanzen wurde der Enzymimmunoassay der Firma Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers mit Modifikationen. Der ELISA beruht auf einem Verdrängungs- bzw. Konkurrenzprinzip, d.h. die LTB<sub>4</sub>-ähnlichen Substanzen im Pollenextrakt konkurrieren mit dem Antiserum. Je mehr LTB<sub>4</sub>-ähnliche Substanzen sich im Pollenextrakt befinden, desto stärker ist die Verdrängung des zugegebenen Antiserums. Dies hat zur Folge, dass sich weniger Antiserum anlagern kann. Das gegen das Antiserum gerichtete Konjugat setzt anschließend zugegebenes Substrat um. Dies erzeugt einen Farbumschlag, der im MRX TC Revalation Mikrotiterplatten Reader der Firma Thermo (Engelsbach, Deutschland) gemessen wird. Je höher die Extinktion, desto mehr Konjugat kann sich anlagern, desto weniger LTB<sub>4</sub>-ähnliche Substanzen sind im Extrakt enthalten.

Je 50 µl der zu untersuchenden Extrakte und Standards wurden im Doppelansatz pipettiert und in einzelnen Wells der Mikrotiterplatte analysiert. Als *Blank* wurde

100 µl Assaybuffer vermessen. Mit Ausnahme des Wells für den Blank wurden 50 µl Antiserum zugegeben und die Platte für 2 Stunden bei RT auf einem Mikrotiterplattenschüttler geschüttelt. Danach wurde in alle Wells Leukotrien B<sub>4</sub> Peroxidase Konjugat zugegeben und für eine Stunde geschüttelt. Um nicht gebundene Substanzen zu entfernen, wurden die Wells viermal mit je 300 µl Waschpuffer gespült. Anschließend wurden 150 µl Substrat zugegeben. Die Reaktion wurde nach 30 min mit 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen den Blank gemessen. Der Messung im MRX TC Revalation Mikrotiterplatten Reader der Firma Thermo (Engelsbach, Deutschland) war im Konzentrationsbereich von 0-800000 pg/ml möglich.

### **PALMs mit immunmodulatorischer Wirkung - PGE<sub>2</sub>-ähnliche Substanzen**

Auch für die Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-ähnlichen Substanzen wurde der Enzymimmunoassay von Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) verwendet. Die Analyse erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Der ELISA arbeitet nach dem Konkurrenzprinzip, siehe Punkt 3.5.3. Die Analyse der Proben und Standards wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Je 50 µl Standard und 50 µl Probe wurden in die Wells der Mikrotiterplatte hineinpipettiert, anschließend 50 µl Antikörper (außer in das Blankwell/100 µl Assaybuffer) dazupipettiert. Danach wurden 50 µl Konjugat dazugegeben und die Platte eine Stunde bei RT geschüttelt. Um alle nicht gebundenen Substanzen wegzuwaschen, erfolgten vier Waschschrte mit je 300 µl Waschpuffer pro Well. Nach Zugabe von 150 µl Substrat kam es zur Substratumsetzung. Dieser Vorgang wurde nach 30 min mit 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Messung im MRX TC Revalation Mikrotiterplatten Reader der Firma Thermo (Engelsbach, Deutschland) war im Konzentrationsbereich von 0-6400000 pg/ml möglich.

### **3.6 Nachweis von biologischer Aktivität im Pollenextrakt**

#### **3.6.1 Bestimmung des antioxidativen Potentials der Pollenextrakte mittels Diphenylpicrylhydrazyl - Test**

Das antioxidative Potential der PBS Pollenextrakte wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Bors (Institut für Strahlenbiologie, GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg) durchgeführt. Die antioxidative Aktivität der PBS Pollenextrakte wurde mit dem kolorimetrischen Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)-Test erfasst. Das Verfahren beruht auf der Reduktion des stabilen Radikals DPPH zu Hydrazin durch Substanzen mit Radikalfängereigenschaften. Zur Bestimmung des antioxidativen Potentials der Extrakte wurden je 2 ml des stabilen Radikals DPPH vorgelegt und Volumina von 10, 20, 30, 40, 50 oder 60 µl eines Pollenextraktes (10 mg Pollen/ml PBS) dazupipettiert. Nach 10 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 517 nm gemessen. Je mehr stabile Radikale zu Hydrazin überführt wurden, desto geringer war die Absorption und desto größer war das antioxidative Potential des Pollenextraktes.

#### **3.6.2 Bestimmung der chemotaktischen Wirkung von Pollenextrakten mittels Migrationsassay**

##### **Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten**

Für die Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten PMN wurden ca. 50 ml Vollblut aus der Armvene von gesunden Probanden in EDTA-Monovetten entnommen. Mittels zweifacher Dichtegradienten-Zentrifugation wurden die PMN abgetrennt. In ein 50 ml Falcon wurde unten 13 ml des Histopaques 1119 (Sigma Diagnostics, St. Luis, USA) vorgelegt darauf 13 ml Histopaque 1077 (Sigma Diagnostics, St. Luis, USA) mit einer 25 ml Pipette übergeschichtet. Als oberste Schicht wurden 20 ml Vollblut zugegeben. Nach der Dichtezentrifugation bei 754xg für 45 min in einer Megafuge 1.0R trennten sich die verschiedenen Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Von oben nach unten hatten sich folgende Schichten ausgebildet: Plasma, mononukleäre Zellen, Histopaque 1077, polymorphonukleäre Zellen, Histopaque 1119 und Erythrozyten. Die obersten drei Schichten wurden verworfen, dann die polymorphonukleären Zellen mit einer

Pipette abgesaugt und in einem 50 ml Falcon gesammelt. Über mehrfache Waschschriffe mit PBS wurden die Zellen gereinigt. Die polymorphonukleären Zellen wurden in 50 ml PBS aufgenommen, anschließend bei 409xg für 20 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zell-Pellet in 20 ml PBS resuspendiert. Der Vorgang der Zentrifugation und das Absaugen des Überstandes wurden wiederholt. Danach wurden residuale Erythrozyten durch einen osmotischen Schock mit 1 ml Aqua dest. lysiert. Sofort im Anschluss daran wurde die Salzkonzentration durch Zugabe einer doppelphysiologischen 1,8%ige Natriumchlorid-Lösung (1 ml) angeglichen. Die 2 ml Zelllösung wurden auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 301xg für 10 min abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zell-Pellet in 5 ml RPMI 1640 Medium Complete resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden 1:10 mit Trypan-Blau verdünnt und anschließend die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen auf 1 Million Zellen pro ml Medium gebracht.

*RPMI-Medium Complete:*

0,5% BSA	1 g
Nicht-essentielle Aminosäuren	2 ml
50mM Mercaptoethanol	200 µl
Pentamycin-Streptomycin	2 ml
L-Glutamin	2 ml
Add RPMI 1640	200 ml

### **Migrationsassay**

Für den Migrationsansatz wurden spezielle Zweikammersysteme von Costar benutzt. In die obere Kammer wurden 100 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von 1 Million Zellen pro ml Medium hineinpipettiert und in die untere Kammer 600 µl des Chemoattraktanz (siehe Abbildung 3.6.1). Die ungerichtete Zellkinese wurde durch Einsetzen von 600 µl Medium statt eines Chemoattraktanzes bestimmt. Als Positivkontrolle wurde das Chemoattraktanz Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) in einer Konzentration von  $3,9 \times 10^{-9}$  mol/l eingesetzt. Die RPMI-Pollenextrakte wurden in Konzentrationen von 1 mg, 3 mg und 10 mg Pollen/ml Medium Complete eingesetzt. Die Inkubation der Granulozyten mit den

Chemoattraktanzien erfolgte für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C. Nach einer Stunde wurden die Netzchen entfernt. Die migrierten Zellen wurden resuspendiert und 300 µl der Zellsuspension in ein 5 ml Durchflußzytometer-Röhrchen pipettiert.

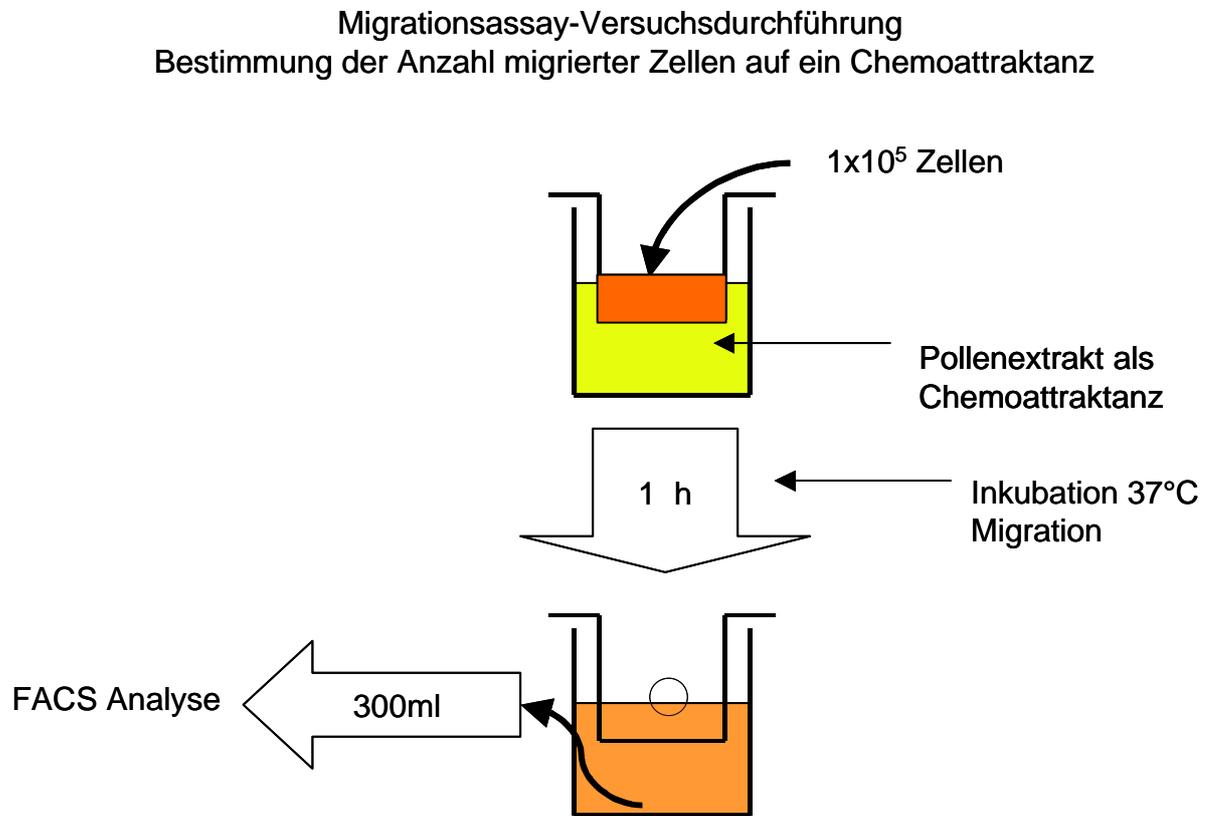


Abbildung 3.6.1: Migrationsassay-Versuchsschema - Bestimmung der Anzahl migrierter Zellen auf ein Chemoattraktanz in der FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter).

### **Bestimmung der migrierten Zellen mittels Durchflusszytometrie**

Die migrierten humanen neutrophilen Granulozyten wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden 300 µl der Zellsuspension der unteren Kammer des Zweikammersystems für 60 Sekunden im FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) angesaugt und gezählt.

Bei der Auswertung durch die Software CellQuestPro (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) werden die neutrophilen Granulozyten durch Gatesetzung von den übrigen Partikeln, wie z.B. Pollenreste, automatisch herausgefiltert. Mittels anschließend errechnetem Migrationsindex (siehe unten)

kann die Potenz der chemotaktischen Wirkung der Pollenextrakte bestimmt werden. Je größer der Migrationsindex, desto mehr Zellen sind auf das Chemoattraktanz migriert.

*Migrationsindex:*

Migrationsindex = Anzahl der migrierten Zellen auf das Chemoattraktanz / Mediumkontrolle

Um die Varianz der einzelnen Blut-Spender auszugleichen und somit die einzelnen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde in jedem Versuch als Positivkontrolle Leukotrien B<sub>4</sub>, das stärkste Chemoattraktanz für neutrophile Granulozyten, eingesetzt. Anhand der Positivkontrolle konnte der standardisierte Migrationsindex (siehe unten) bestimmt werden und die chemotaktische Wirkung der Pollenextrakte auf humane neutrophile Granulozyten zwischen den einzelnen Versuchen verglichen werden.

*Standardisierter Migrationsindex:*

Standardisierter Migrationsindex = Pollenextrakt-Migrationsindex / Migrationsindex der Positivkontrolle

### **3.7 Nachweis des Enzyms Lipoxygenase in Pollen**

Der Nachweis der Lipoxygenase erfolgte mittels Westernblot. Für den Antikörpernachweis von Lipoxygenase stand ein polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen die Gurken- (HV) bzw. Gerste- (LB) Lipoxygenase, von Professor Feußner (Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut der Pflanzenwissenschaften, Universität Göttingen) zur Verfügung. Lipoxygenase ist ein ca. 100 kDa Protein. Für die Auftrennung des Proteinextraktes eignete sich ein 7,5%iges Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel. Anschließend wurden die Proteine im Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Detektion des Lipoxygenaseantikörpers erfolgte mit einem alkalisch-konjugierten Phosphatase Zweit-Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war.

*Vorgehen*

*Vorbereitend wurden mehrere Lösungen hergestellt:*

SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)*Sammelgel*

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	0,67 ml
4 x Sammelgelpuffer 0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
10% SDS	0,05 ml
Aqua bidest	3 ml
10% APS	25 µl
TEMED	4 µl

*Trenngel*

Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	2,5 ml
4 x Trennpuffer 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
Aqua bidest	4,85 ml
TEMED	5 µl
10% APS	50 µl

*10 x Elektrophoresepuffer (500ml)*

25 mM Tris pH8,3	15,14 g
192 mM Glycin	72,07 g
10% SDS	5 g

*2 x Laemmli-Probenpuffer*

4 x Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	2,5 ml
10% SDS	4 ml
Glycerol	2 ml
1% Bromphenolblau	90 µl
Aqua bidest	410 µl

Zur Reduktion der Disulfidbrücken in den Proteinen wurde kurz vor dem Gebrauch des Laemmlipuffers DTT in einer 1:10 Verdünnung (30 mg DTT auf 100 µl Wasser) dazugegeben.

---

Vorbereitung des Blottes*Kathodenpuffer (500 ml)*

40 mM 6-Aminocapronsäure	5,25 g
20% Methanol	100 ml
0,01% SDS	0,05 g

*Anodenpuffer II (500 ml)*

25mM Tris pH 10,4	1,51 g
20% Methanol	100 ml

*Anodenpuffer I (500ml)*

300mM Tris pH 10,4	18,17 g
20% Methanol	100 ml

*Waschpuffer I (500ml)*

100 mM Tris pH 7,4	6,06 g
100 mM NaCl	2,92 g
2,5 mM MgCl x 6 H <sub>2</sub> O	254 mg

*Waschpuffer II (500ml)*

100 mM Tris pH 7,4	6,06 g
100 mM NaCl	2,92 g
2,5 mM MgCl x 6H <sub>2</sub> O	254 mg
0.05% Tween-20	0,25 ml

*Waschpuffer III (500ml)*

100 mM Tris pH 9,5	6,06 g
100 mM NaCl	2,92 g
2,5 mM MgCl x 6H <sub>2</sub> O	254 mg

## **Züchtung von Gurkenkeimlingen als Kontrolle**

Für Kontrollansätze wurden Gurkenkeimlinge gezüchtet. Dies war nötig, um damit die Methoden der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), des Westernblotes und des Antikörpernachweises zu optimieren, da zunächst nicht sichergestellt war, dass der Lipoxygenase-Antikörper mit Proteinextrakten von Birkenpollen bzw. Graspollen reagieren würde. Zum Züchten der Gurkenkeimlinge wurde eine 10 x 15 x 3 cm große Plastikschaale mit Watte ausgelegt. In einem Abstand von 2 cm wurden mehrere Gurkensamen leicht in die Watte gedrückt. Die Watte wurde gut befeuchtet und die Schale drei Tage im Dunkeln bei RT aufbewahrt. Drei gewachsene Gurkenkeimlinge wurden mit einem Skalpell zerkleinert und ein SDS-haltiger Proteinextrakt hergestellt.

### **3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Bei dieser Methode nach Laemmli (1970) werden die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Proteine werden mit SDS negativ geladen und wandern dadurch nach einer Spannungsanlegung zur Anode. Kleinere Moleküle wandern aufgrund der geringeren Reibung im Gel schneller als größere Moleküle, somit kommt es zur Längenauftrennung der Proteine im Proteingemisch. Je nach gewählter Porengröße des SDS-Polyacrylamid-Gels kann ein bestimmter Längenbereich optimal aufgetrennt werden. Anfangs müssen die Proben durch ein Sammelgel wandern. Daran schließt sich ein engmaschigeres Trenngel an. An diesem Gel-Übergang wird das Protein aufkonzentriert. Dies führt im Trenngel zu einer schärferen Proteinbande.

#### *Gelvorbereitung*

Eine 7 cm x 10 cm große Glasplatte, eine Keramikhinterseite und zwei Platzhalter wurden zu einer Gelkassette zusammengesteckt und in die Gelgießkammer von Biorad eingespannt. Zuerst wurden 3,9 ml Trenngel-Lösung in die Gelkassette hineingegossen. Um eine ebene Geloberfläche zu erhalten, wurde mit Isopropanol überschichtet. Das Gel polymerisiert nach einer Stunde aus. Zum Entfernen des Isopropanols wurde die Gelkassette mit Wasser gespült und anschließend das restliche Wasser mit einem Papierhandtuch aufgesaugt. Das obere Ende des Trenngels wurde auf der Glasplatte mit einem Stift nachgezogen, um diese Stelle

später leichter wieder zu erkennen. Die Gelkassette wurde aus der Gießkammer entfernt und in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Jetzt wurden 2,0 ml Sammelgellösung daraufpipettiert und ein Teflonkamm zum Aussparen der Taschen hineingesteckt. Mit einem wasserfesten Stift wurden die Taschen umzeichnet. Der Elektrophoresepuffer wurde 1:10 verdünnt und 200 ml davon in die Elektrophoresekammer gegossen. Jetzt konnte der Kamm vorsichtig herausgezogen werden.

#### *Probenvorbereitung und Lauf*

Zum Auftrennen der Proben wurden mehrere Taschengrößen verwendet. Eine 4 cm große Tasche eignete sich besonders, da der Antikörpernachweis noch für die Pollenproteinextrakte optimiert werden musste. Aus dem 4 cm breiten Blot konnten 3 mm breite Streifen abgeschnitten werden, die alle unter anderen Bedingungen weiter behandelt wurden. Die Proben wurden 1:2 mit 2x Laemmlipuffer verdünnt und für 5 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und anschließend in die Taschen mit einer Hamiltonspritze eingefüllt. Die maximale Einfüllmenge betrug 80 µl. In der ersten Tasche wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Der Deckel der Laufkammer wurde geschlossen und die Proteinauftrennung bei einer Spannung von 100 V gestartet. Sobald der Laufpuffer die farbig markierten Stelle erreichte, und somit die Proben am Trenngel angekommen waren, konnte die Voltzahl auf 160 V gestellt werden. Die Auftrennung wurde beendet, wenn die blaue Laufpufferfront aus dem Gel gelaufen war. Die Gelkassette wurde herausgenommen, vorsichtig geöffnet und das Sammelgel entfernt.

### **3.7.2 Westernblot**

Bei dieser Methode werden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran im Semi-Dry Blot Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) übertragen.

#### *Vorbereitung des Blottes*

In der Größe des Geles wurden Blotpapiere zugeschnitten. Für 10 min wurden drei Blotpapiere in den Kathodenpuffer gelegt, eines in den Anodenpuffer II und

zwei in den Anodenpuffer I. Die Nitrozelluloseblotmembran kam für 10 min in die Wanne mit dem Anodenpuffer II.

Auf das Blotgerät wurden drei Filterpapiere Kathodenpapier gelegt. Dabei war es wichtig, dass sich zwischen den Filterpapieren keine Luftblasen befanden, da sonst kein optimaler Proteintransfer gewährleistet war. Zu diesem Zweck wurde mit einem Glasstab vorsichtig über die einzelnen Filterpapiere gerollt, um eventuelle Luftblasen an der Seite herauszudrücken. Jetzt wurde das Gel vorsichtig von der geöffneten Glaskassette entfernt und für 5 min im Kathodenpuffer gewaschen. Anschließend wurde das Gel behutsam auf die vorbereiteten Kathodenblotpapiere geschichtet. Über das Gel wurde die Nitrocelluloseblotmembran gelegt, darüber das Filterpapier mit Anodenpuffer II und darauf zwei Filterpapiere mit Anodenpuffer I. Auch hier war es wichtig, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bildeten und damit ein guter Proteintransfer stattfinden konnte.

#### *Blotvorgang*

Pro Quadratcentimeter Gel wurde ein Strom von 0,8 mA für 90 min angelegt. Für einen optimalen Proteintransfer wurde die Blotapparatur noch zusätzlich von oben mit einer vollen 2 l Flasche beschwert.

#### *Anfärben der Membran und des Gels zur Kontrolle des Proteintransfers*

Nach Beendigung des Blotvorganges wurden die Proteine auf der Membran für 3 min mit Ponceau S angefärbt. Dies diente zur Kontrolle des Proteintransfers vom Gel auf die Membran. Das Membranstück, auf welches der mitgeführte Molekulargewichtsmarker beblottet war, wurde abgeschnitten, um später einen Größenvergleich zu den Proteinbanden der Probe zu erhalten. Die restliche Membran wurde mit Wasser entfärbt, um einen Antikörpernachweis durchzuführen. Die Membran wurde getrocknet und bei  $-25^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um später weiterbearbeitet zu werden.

Zur Kontrolle, dass alle Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran gewandert waren, wurde das Gel über Nacht in eine Wanne mit Coomassiereagenz gelegt. Dies diente als weitere Kontrolle für einen erfolgreichen Proteintransfer. Auf dem Gel sollten keine Banden mehr erkennbar sein.

### 3.7.3 Qualitativer Lipoxygenase Nachweis mittels Antikörper

Für den Nachweis der Lipoxygenase stellte Professor Feußner (Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut der Pflanzenwissenschaften, Universität Göttingen) zwei polyklonale Antikörper aus Kaninchen, die gegen die Gurken- (HV) bzw. Gersten-Lipoxygenasen (LB) gerichtet waren, dankenderweise zur Verfügung.

Der Blot wurde in mehrere 3 mm dünne Streifen geschnitten, um mit verschiedenen Streifen, aber demselben Blot, den Antikörpernachweis zu optimieren. Diese Streifen wurden einzeln in 1% Ovalbumin in 2 ml Waschpuffer I bei RT für 2 Stunden abgeblockt. Verdünnungen 1:500 und 1:1000 des Lipoxygenaseantikörpers, in Waschpuffer II, wurden getestet. Die Streifen wurden über Nacht 1 ml des entsprechenden Puffers inkubiert und anschließend mit Waschpuffer II dreimal je 10 min gewaschen. Dann wurden die Streifen in dem 2. Antikörper, der gegen IgG des Kaninchen gerichtet war, für eine Stunde inkubiert. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2500 oder 1:5000 eingesetzt. Die Streifen wurden abermals mit Waschpuffer II für zweimal 10 min gewaschen. Beim dritten Waschschrift wurde mit dem Waschpuffer III gewaschen. Dies erleichterte die Substratumsetzung. Währenddessen erfolgte die Auflösung einer BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium)-Substrattablette in 10 ml Wasser unter Lichtausschluss. Für maximal 15 min wurden die einzelnen Streifen mit dem Substrat inkubiert. Dort, wo sich der zweite Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert war, anlagern konnte, kam es zur Substratumsetzung und eine schwarze Bande auf dem Blot wurde sichtbar. Die Reaktion wurde gestoppt, indem für 10 Minuten die Streifen mit Wasser gespült wurden und es dadurch zur Substratentfernung kam. Für die Aufbewahrung der Streifen wurden diese getrocknet.

## 3.8 Identifizierung von Stressgenen in Birkenpollen mittels

### *Arabidopsis thaliana* Stressgen-cDNA-Mikroarray

Der Mikroarray wurde in Kooperation mit PD Dr. Durner und Dr. von Rad (Institut für Biochemische Pflanzenpathologie, GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg) durchgeführt. Ein Screeningverfahren von exprimierten

Birken-Genen mittels Mikroarray liegt aufgrund der fehlenden Gensequenzen von Birke nicht vor. Deswegen wurde versucht, sich Sequenzhomologien von *Arabidopsis* und *Betula* zu Nutze zu machen und ein *Arabidopsis*-Stressgen Mikroarray als Screening-Verfahren verwendet. Bei Sequenzhomologien zwischen *Arabidopsis* und *Betula* sollte es zur Hybridisierung der Birken-cDNA mit den Sonden kommen. Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Birkenpollen von einem Standort mit niedrigem (104) und einem Standort mit hohem Verkehrsaufkommen (IV) wurden herausgearbeitet. Der Array wurde nach der Methode von Huang et al. (2002) durchgeführt.

### 3.8.1 RNA Isolierung aus Birkenpollen

Die RNA-Isolierung aus Birkenpollen erfolgte mit dem Quiagen RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland). Es wurden je 100 mg Birkenpollen für 15 min in Trockeneis mit dem Mörser zerkleinert. Die gemörserten Pollen wurden in ein 50 ml Falcon umgefüllt und nachfolgend 1 ml RTL-Puffer (Quiagen) mit 1% Mercaptoethanol zugefügt. Nach dem Auftauen der Lösung wurde diese gut gevortext und in ein Quiagen-Shredder-Gefäß überführt. Die zweiminütige Zentrifugation bei 17000xg ermöglichte ein vollständiges Aufschließen der Probe. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß um-pipettiert und mit 350 µl Ethanol durch Auf- und Ab-pipettieren vermischt. Die Lösung wurde sukzessive in ein Membranröhrchen für 15 Sekunden bei 17000xg zentrifugiert, bis alle Flüssigkeit durch die Membran gelaufen war. Dabei heftet sich die RNA an die Membran an. Mit 700 µl Waschpuffer 1 wurde die Membran durch 15 sekundige Zentrifugation bei 17000xg gewaschen und danach zweimal mit je 500 µl RPE Puffer für 2 min bei 17000xg zentrifugiert. Anschließend wurde die Membran durch Zentrifugation des Gefäßes für eine Minute bei 17000xg getrocknet. Die Eluation der RNA erfolgte mit 40 µl RNase-freiem-Wasser. Das Eluat wurde ein zweites Mal in das Gefäß pipettiert, um eventuell hängengebliebene Rest-RNA durch eine wiederholte Zentrifugation von der Membran zu lösen. Dieses Vorgehen ermöglichte es, hoch konzentrierte RNA in wenig Flüssigkeit zu gewinnen.

### *Überprüfung der RNA-Qualität in einem 1%igem Agarose Gel*

0,5 g Agarose wurde in 5xTBE (Tris-Borate-EDTA) Puffer in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde 0,5 µl Ethidiumbromid (1:100) zupipettiert und in der Gellösung verteilt. Die Gellösung wurde in die vorgesehene Gelkammer gegossen und der Taschenkamm eingesetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde der Taschen-Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophorese-Apparatur gelegt. Je 1 µl RNA wurde mit 1 µl Ethidiumbromid (1:10), 1 µl Laufpuffer und 3 µl RNA-freiem-Wasser vermischt und in eine Tasche pipettiert. Die Fragmente bewegen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Struktur (Zucker-Phosphat-Rückrat) im elektrischen Feld zur Anode, dabei wandern größere Fragmente aufgrund ihrer Reibung langsamer als kleinere Fragmente durchs Gel. Es wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nach einer 2 cm Laufdistanz, erkennbar durch den mitgelaufenen Laufpuffer, wurde die Auftrennung gestoppt. Das Gel wurde aus der Elektrophorese-Apparatur herausgenommen und im GelDOC-System der Firma Biorad (München, Deutschland) mit UV angeregt. Die Gesamt-RNA besitzt als Hauptmenge klar definierte einheitliche Größenklassen. Wenn im Gel die Banden der 28 S rRNA und 18 S rRNA eindeutig erkennbar sind, ist es zu keiner Degradation aufgrund von Verunreinigungen bei der Probenvorbereitung gekommen.

### *Bestimmung der RNA-Konzentration im Eppendorf-Photometer*

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA 1:50 verdünnt und 50 µl in einer Küvette (UVette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermessen. Als Blank diente RNA-freiem-Wasser. Dabei wurde auch durch den Quotienten der Absorptionen 260 nm/280 nm die Reinheit überprüft, der bei reiner RNA bei 2 liegt. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung von Protein hin, da die Konzentration der Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen wird.

### **3.8.2 RT-PCR zur Herstellung von Birkenpollen-cDNA**

Für die Herstellung von Birkenpollen cDNA wurde der „1st Strand cDNA Synthesis Kit“ für RT-PCR der Firma Roche (Penzberg, Deutschland) eingesetzt. Als optimal erwies sich, vor der cDNA Herstellung die RNA auf 65°C zu erhitzen. Anschließend wurde die RNA für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und danach sofort in

den cDNA-Mix gegeben. Nur so konnte ein Produkt bei der PCR erzielt werden. Pro Reaktionsansatz wurden folgende Lösungen auf Eis in 0,2 ml Eppendorfgefäßen zusammenpipettiert:

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
10x Reaktionspuffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
Desoxynucleotid Mix	2 µl
Oligo-p(dT) <sub>15</sub> Primer	2 µl
Wasser	7,2 µl
Rnase Inhibitor	1 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,8 µl
RNA	1 µl (1 µg)

Die RT-PCR erfolgte im Thermozykler. Es wurde folgendes Temperaturprogramm eingestellt:

<i>Temperatur</i>	<i>Funktion</i>	<i>Zeit</i>
25°C	Annealing	10 min
60 min	Extension	42°C
99°C	Enzymaktivierung	5 min
4°C	Abkühlung	1 h

Nach Beendigung des Programms wurde die cDNA bei -25°C für weitere Analysen eingefroren.

### 3.8.3 Qualitäts-Kontrolle der cDNA mittels Polymerasekettenreaktion

Um RNA- und cDNA-Herstellung zu überprüfen, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) der Firma Thermo Life Science (Egelsbach, Deutschland) mit den spezifischen Primerpaaren für 18 S rRNA (Referenzgen) und Bet v 1 (Hauptallergen von Birke) bezüglich ihrer Annealing-Temperatur und Zyklenzahl optimiert.

Pro Reaktionsansatz wurden folgende Lösungen in ein 0,2 ml Eppendorfgefäß pipettiert:

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>
10x Reaktionspuffer	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
PCR Wasser	28,5 µl
<i>Taq</i> Polymerase	0,5 µl
cDNA	10 µl

Für die Amplifikation der Genfragmente wurde folgendes optimierte PCR-Temperaturprogramm verwendet:

<i>Temperatur</i>	<i>Funktion</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklus</i>
95°C	Vordenaturierung	5 min	1 x
95°C	Denaturierung	1 min	} 45 x
55°C	Primer-Hybridisierung	1 min	
72°C	Extension	1 min	
4°C	Abkühlung	hold	1 x

Primersequenz

18 S rRNA	5'TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA 5'AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCTT	136 bp
Bet v 1	5'ATGGGTGTTTTCAATTACGAAACTGAG 5'TTAGTTGTAGGCATCGGAGTGTGCCAAGAGG	480 bp

### 3.9 2D Gelelektrophorese

Die 2D Gelelektrophorese wurde in Weihenstephan, Fachgebiet Proteomics, in Zusammenarbeit mit Frau Professor Görg durchgeführt.

#### 3.9.1 Probenaufbereitung

Je 100 mg Pollen wurden für 15 min in Trockeneis mit einem Mörser zerkleinert. Der vollständige Aufschluss der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer

A oder B (siehe unten) und anschließender Ultraschallbehandlung (Zyklus 9, Power 20%, 2 x 30 sec) auf Eis. Die Probe wurde 30 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der pH-Wert der Probe wurde mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

*Lysepuffer A:*

9M Harnstoff

30mM Tris

4% CHAPS

2% Pharmalyte 3-10

2% DTT

*Lysepuffer B:*

7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff

40 mM Tris

4% CHAPS

2% Pharmalyte 3-10

2% DTT

Falls die Proben Fluoreszenz markiert werden sollten, kam es erst nach der Markierung der Proteine zur Zugabe von 2% Pharmalyte 3-10 und 2% DTT.

### **3.9.2 Bestimmung der Protein-Quantität**

Der Proteintest erfolgte mittels 2D Quant Kit von Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) nach den Angaben des Herstellers.

### **3.9.3 Rehydrierung von Immobilisierten- pH-Gradienten (IPG)-Streifen**

Zur Rehydrierung der Immobilisierten-pH-Gradienten-(IPG)-Streifen wurden 350 µl Quelllösung (siehe unten) pro Streifen in eine Quellkassette geben. Die Schutzfolie der IPG-Streifen wurde entfernt. Mit der Gelseite nach unten wurden die Streifen luftblasenfrei in eine Abteilung hineingelegt und mit 1 ml Siliconöl überschichtet. Die Rehydrierung der IPG-Streifen erfolgte über Nacht. Anschließend wurden die IPG-Streifen mit 10 sec. mit bidestilliertem Wasser gespült, um den überschüssigen Harnstoff zu entfernen und vorsichtig mit Filterpapier abgetupft. Die Streifen wurden entweder sofort weiter verwendet oder bei -80°C eingefroren.

*Quelllösung A:*

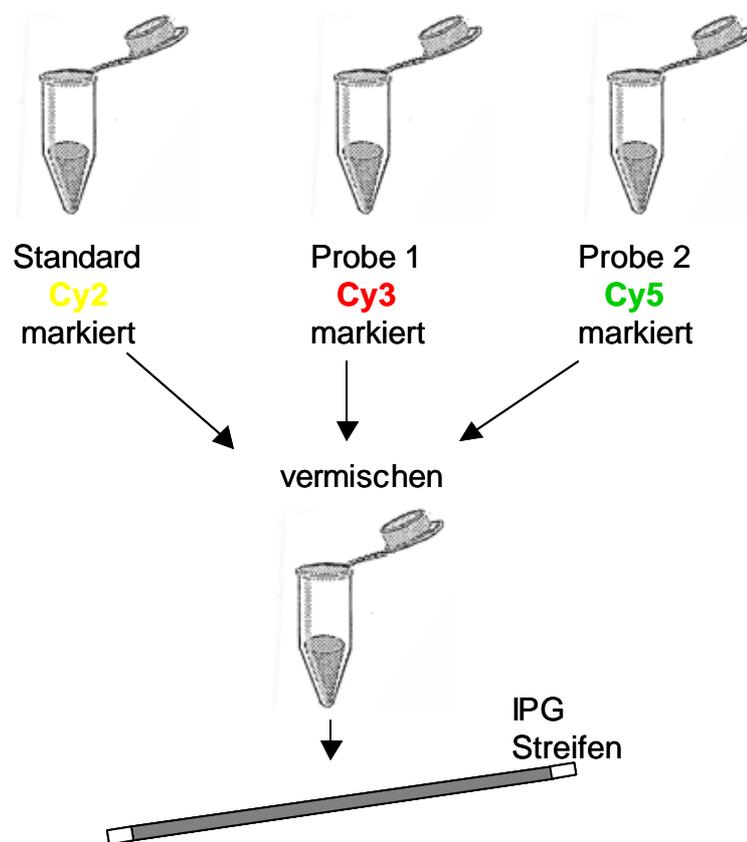
8 M Harnstoff, 1% CHAPS, 0,4% DTT, 0,5% Pharmalyte 3-10

*Quelllösung B:*

6 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1% CHAPS, 0,4% DTT, 0,5% Pharmalyte 3-10

**3.9.4 Markierung der Probe für die Difference Gelelektrophorese (DIGE)**

Pro Probe wurden 100 µg Protein mit 800 pM CyDye Fluoreszenz Farbstoffen (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) markiert (30 min im Dunkeln auf Eis). Dabei bindet die Farbstoffmarkierung kovalent an das Lysin der Proteine. Pollenproteine von Landbirken wurden mit Cy3, Pollenproteine von Stadtbirken mit Cy5 und der interne Standard mit Cy2 markiert. Der interne Standard setzt sich zu gleichen Teilen aus jeder der zu untersuchenden Proben zusammen. Die Beendigung der Markierung erfolgte durch Zugabe von 2 µl 10 mM Lysin, welches den überschüssigen Farbstoff abfängt (10 min im Dunkeln auf Eis). Vor der ersten Fokussierung der Proteine sind für ein Gel je 100 µg Protein des internen Standards, einer Land- und einer Stadtprobe vermischt worden (siehe Abbildung 3.9.1). Der entscheidende Vorteil durch das Mitführen des internen Standards in jedem Gel ist, dass sowohl die Varianzen innerhalb eines Gellaufes, wie auch beim Vergleich von mehreren Gelen aufgehoben werden. Dadurch können relative Proteinexpressionsunterschiede von vier einzelnen Stadtpollen-Proteinextrakten gegenüber vier einzelnen Landbirken-Proteinextrakten untersucht werden.



Auftrennung von drei Proteinextrakten (Standard, Probe 1, Probe 2) in einem SDS Gel

Abbildung 3.9.1: Difference Gelelektrophorese (DIGE) - Fluoreszenzmarkierung des internen Standards und der Proben mit Cy2, Cy3 oder Cy5. Proteinauftrennung in einem SDS Gel.

### 3.9.5 Proteinfokussierung in der ersten Dimension

Für die Fokussierung der Proteine in der ersten Dimension kam ein Dry Strip Kit (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) zum Einsatz. Zuerst wurde die Kühlplatte des Multiphore II Geräts mit Kerosin benetzt, um eine optimale Temperaturübertragung zu gewährleisten, sobald das Dry Strip Kit darauf gesetzt wurde. 20 ml Öl wurden hineingegossen und die Folie, auf die die IPG-Streifen gelegt wurden, eingesetzt. An die Enden der IPG-Streifen wurden Filterpapiere, die mit destilliertem Wasser getränkt waren, gelegt. Die Elektroden wurden leicht auf den Filterpapieren angedrückt. Die Probencups auf einer Brücke wurden auf der anodalen Seite aufgesetzt. Um eine Austrocknung zu verhindern und

gleichzeitig die Dichte der Probecups zu kontrollieren, wurde mit 60 ml Öl beschicht. Pro Probencup wurden 300 µg Proteinmischung aufgetragen und mit 25 µl Öl überschichtet. Der Deckel wurde geschlossen und der Elektrophoreselauf bei konstanter Temperatur von 20°C gestartet.

Bei präparativen Gelen erfolgte zusätzlich zu dem anodalen Auftrag der kathodale, um eine ausreichende Menge an Protein laden zu können.

*Elektrophoretische Laufbedingungen in der Multiphore:*

anodaler Auftrag von 300 µg Protein in Probencups:

50 µA pro IPG-Streifen, pH-Gradient 4-7

Einlauf: 20°C, 150 V 1 h, 300 V 30 min, 600 V 1 h

Lauf: 20°C, 3500 V, Filterstreifen-Wechsel alle 3 h

Stop nach 42 000 Vh

*Präparative 2D Elektrophorese in der Multiophore:*

Auftrag von 600 µg Protein in Probencups, anodaler und kathodaler Auftrag

50 µA pro IPG-Streifen, pH-Gradient 4-7

Einlauf: 20°C, 150 V 1 h, 300 V 1 h, 600 V 1 h

Lauf: 20°C, 3500 V, Filterstreifen-Wechsel alle 3 h

Stopp nach 45 000 Vh

### **3.9.6 Äquilibration der Immobilisierten-pH-Gradienten (IPG)-Streifen**

Nach der Proteinfokussierung in der ersten Dimension wurden die IPG-Streifen für 15 min in 100 ml Äquilibrationpuffer (siehe unten) mit 1 g DTT geschüttelt. Die Lösung wurde verworfen und anschließend die IPG-Streifen für 15 min in 100 ml Äquilibrationpuffer mit 4 g Jodacetamid geschüttelt .

*Äquilibrationpuffer:*

6 M Harnstoff, 30% Glycin, 2% SDS, 50 mM Puffer D (90,83 g Tris, 2 g SDS, pH 8,6 (HCl), 228,5 ml H<sub>2</sub>O)

### 3.9.7 Proteinauftrennung in der zweiten Dimension

#### *Gelvorbereitung*

Die Gelgießkassette Ettan Dalt setzt sich aus 14 Glaskassetten, die durch Folien getrennt wurden, zusammen. Die Gellösung (siehe unten) wurde von unten hinein gegossen. Mit einer 50% Glycerinlösung - angefärbt mit Bromphenolblau - wurden die Gele unterschichtet, um die Gellösung in den Glaskassetten zu halten und durch Luftausschluss die Gelpolymerisation zu erleichtern. Um einen ebenen Abschluss an der oberen Gelkante zu bekommen, wurde mit 1 ml Butanol, der mit Puffer D gesättigt war, überschichtet. Die Auspolymerisierung der Gele erfolgte über Nacht. Die Glaskassetten wurden herausgenommen und mit Wasser abgespült. Das SDS-Gel hatte die Größe von 200 mm x 237 mm x 1 mm.

#### *Gellösung: T 14% Gele (900 ml):*

409,5 ml Acrylamidlösungen

225 ml Puffer D

225,5 ml H<sub>2</sub>O

45 ml Glycerol

60 µl TEMED

6,37 ml APS (10%)

#### *Ettan Dalt Laufvorbereitung:*

Der Tankpuffer (siehe unten) wurde in den Ettan Tank bis zur unteren Markierung eingefüllt. Die IPG-Streifen und die Molekulargewichtsmarker wurden oben in die Glaskassette geschoben und mit 3 ml Bromphenolblau gefärbter Agarose überschichtet. Danach wurden die Gelkassetten in den Ettan Tank geschichtet. Der doppelt konzentrierte Laufpuffer wurde bis zur oberen Markierung gegossen und der Lauf gestartet.

#### *Laufpuffer:*

19,9 g SDS, 299,6 g Glycin, 58 g Tris in 5 l

davon 1,875 l mit 5,625 l in den Tank

#### *Elektrophoretische Laufbedingungen im Ettan Dalt-System:*

20°C, 72 mA 1 h, 100 mA 1 h, 240 mA über Nacht.

---

Sobald die Bromphenolblaufront unten aus dem Gel austrat, wurde der Lauf gestoppt. Die Glaskassetten wurden vorsichtig aus dem Tank gehoben und geöffnet. Das Gel wurde ohne den IPG-Streifen in 500 ml Fixierlösung (siehe unten) über Nacht gelegt.

Fixierlösung: 40% Ethanol, 10% Eisessig, 50% bidestilliertes H<sub>2</sub>O

### **3.9.8 Proteinvisualisierung**

#### **Silberfärbung**

500 ml der jeweiligen Lösungen (siehe unten) wurden für ein Gel zur Silberfärbung modifiziert nach Blum et al. (1987) benötigt.

##### *Vorgehen:*

Waschen der Gele: 3x20 min mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O

Inkubation mit Silbernitrat: 2 g Silbernitrat pro gekühltem Liter bidestilliertem H<sub>2</sub>O plus 250 µl Formaldehyd für 20 min

Waschen der Gele: 2x20 sec in bidestilliertem H<sub>2</sub>O

Entwickeln: 30 mg Natriumcarbonat pro gekühltem Liter bidestilliertem H<sub>2</sub>O, 500 µl Formaldehyd, 5 mg Natriumthiosulfat

Waschen der Gele: 1x20 sec in bidestilliertem H<sub>2</sub>O

Stoppen: 10 g Glycin/ 1 l bidestilliertem H<sub>2</sub>O

Waschen: 30 min bidestilliertem H<sub>2</sub>O

#### **Coomassiefärbung**

500 ml der jeweiligen Lösungen (siehe unten) wurden für ein Gel benötigt

##### *Vorgehen:*

Waschen der Gele: 30 min 25% Ethanol, 8% Eisessig, 67% bidestilliertem H<sub>2</sub>O.

Färben: 3 h oder über Nacht, 0,1% Serva Blue R in 45% Ethanol und 10% Eisessig

Entfärben bis zur gewünschten Farbintensität: 1x10 min in 25% Ethanol, 8% Eisessig; 2-4 x 30-60 min in 25% Ethanol, 8% Eisessig

## Fluoreszenz

Gele mit Fluoreszenz markierten Proteinen wurden mit dem Scanner Thyphoon 9400 mit verschiedenen Wellen angeregt (siehe Tabelle 3.9.1) und eingescannt.

Tabelle 3.9.1: Emissionsfilter und Laserkombinationen für die CyDye Farbstoffe.

Fluorophor	Emissionsfilter (nm)	Laser
Cy2	520 BP 40	Blue (488)
Cy3	580 BP30	Green (532)
Cy5	610 BP 30	Red (633)

Die Intensität des Photomultipliers wurde für jedes Gel separat optimiert. Die maximale Spotintensität musste unter 100000 relative Einheiten liegen, um für die Quantifizierung der Spots die gesamte Linearität der Spoterkennung von  $10^5$  ausnutzen zu können. Die Auflösung betrug 100 „Micons“.

### 3.9.9 Software unterstützte quantitative Auswertung der Gele mittels

#### DeCyder

Zur quantitativen Auswertung der Gele wurde das Softwareprogramm DeCyder (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet. Die bestehen aus drei Teilen: (a) „differential in-gel analysis“, (b) „biological variation analysis“, (c) „batch analysis“.

Im einzelnen wurden die Gele einzeln analysiert, um die internen Variationen auszugleichen und eine optimale Spoterkennung zu gewährleisten. Dies erfolgte mit der „differential in-gel analysis“ mit den Parametern: Spotdetektion Spotanzahl 3000, Spot Volumen 50000, Peak-Höhe 100. Anschließend wurden alle Gele mit der „biological variation analysis“ untersucht. Hier wurden die Gel- zu Gelvariationen berücksichtigt. In der „batch analysis“ erfolgte die Übereinanderlagerung von allen Gelbildern und die Abundanz-Bestimmung der Proteinspots.

---

Verschiedene Ergebnis-Visualisierungs-Möglichkeiten halfen bei der Interpretation der Ergebnisse:

#### *Statistische Auswertung*

Die statistischen Analysen zur Vergleichs-Studie von Landpollen-Spots und Stadtpollen-Spots konnten im „Tabel-View-Modus“ abgerufen werden.

#### *Beurteilung der Spotqualität*

Die Grafik-Ansicht ermöglichte es, die standardisierten Intensitäten der einzelnen Proben zueinander, zu analysieren. Durch den 3D Modus konnte die Qualität der Spots beurteilt werden. Zudem konnte die Überlagerung der Proteine genau verifiziert werden (Matchqualität).

#### *Spot Matching*

Die automatisierte Überlagerung (Matching) der Spots wurde manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Dazu standen folgende Werkzeuge zur Verfügung:

-„merge Spots“: falls ein Proteinspot fälschlicherweise von der automatischen Auswertung als zwei Proteinspots angegeben wurde, konnte der Spot manuell zusammengesmolzen werden.

-„landmarks“: Kennzeichnung von Proteinen, die in jedem Fall übereinander gelagert werden sollten.

-„detach spots“: Spots, die fälschlicherweise von der automatischen Auswertung, übereinander gelegt wurden, konnten manuell getrennt werden.

### **3.9.10 Dokumentation der Gele**

Zu Dokumentarzwecken wurden die Gele eingescannt. Anschließend wurden die Gele in 10% Glycerin, 30% Ethanol und 60% destilliertem Wasser geschrumpft und zur Aufbewahrung in Einwegfolie getrocknet.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Programme SPSS, Excel, Sigma Plot oder DeCyder.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 *In vivo* Exposition von Birkenpollen**

#### **4.1.1 Charakterisierung der Umweltbelastung an den Birken-Standorten**

Um den Einfluss der Umwelt auf Pollen zu untersuchen war es nötig, die Birkenstandorte entsprechend ihrer Verkehrslage und der Schadstoffexposition zu charakterisieren. Standardisierte Erhebungsbögen wurden direkt am Pollen-Sammeltag ausgefüllt (siehe Punkt 4.1.1.1 und Appendix). Die Stickstoffdioxid-Konzentrationen - als Indikator für Verkehrsbelastung - wurden an speziellen Standorten für den Zeitraum von einer Woche zur Pollenflug-Zeit bestimmt (siehe Punkt 4.1.1.2). Zudem wurden Pollen von Birken gesammelt, die in unmittelbarer Nähe zu den Umweltmessstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU) stehen, um den Einfluss weiterer Schadstoffe analysieren zu können (siehe Punkt 4.1.1.3). Eine Übersicht der einzelnen Birken-Standorte mit den bestimmten Umweltparametern ist der nachfolgenden Tabelle 4.1.1 zu entnehmen.

Tabelle 4.1.1 Sammeljahr und Standorte der Birken, von denen Pollen gesammelt wurden. Die Umweltdaten wurden durch eigene Messung von Stickstoffdioxid ermittelt oder den Messdaten der Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU) entnommen.

Standortnr.	Standort	Sammeljahr	Umweltdaten 2002/2003	Expositions- Gruppe
5	Heckenstallerstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid	Stadt (München)
15	Weinbergerstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid (nur 2002)	
22	Ungererstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid	
32	Drygalskiallee	2002/2003	Stickstoffdioxid	
33	Mozartstraße	2002/2003	Stickstoffdioxid	
II	Dachauerstraße	2002/2003	Messstation LfU	
III	Westendstraße	2002/2003	Messstation LfU	
IV	Luise-Kiesselbach Platz	2002/2003	Messstation LfU	
V1	Landsbergerstraße	2003	Messstation LfU	
V2	Landsbergerstraße	2003	Messstation LfU	
I	Johanneskirchen	2002/2003	Messstation LfU	Land
100	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid	
101	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid	
102	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid	
103	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid	
104	Landkreis Freising	2003	Stickstoffdioxid	

*In vivo* exponierte *Betula*-Pollen wurden 2002 in München und ab 2003 zusätzlich in der ländlichen Region im Norden Münchens gesammelt. Zehn Stadtbirken in den Straßen Heckenstallerstraße (Nr. 5), Weinbergstraße (Nr. 15), Ungererstraße (Nr. 22), Drygalskiallee (Nr. 32), Mozartstraße (Nr. 33), Dachauerstraße (Nr. II), Westendstraße (Nr. III), Luise-Kiesselbachplatz (Nr. IV), Landsbergerstraße (Nr. V1) und Landsbergerstraße (Nr. V2) wurden für die Stadtgruppe ausgewählt. Eine Birke aus Johanneskirchen, Musenbergstraße (Nr. I) und fünf weiterer Landbirken aus dem Landkreis Freising (Nr. 100-104) bildeten die Landgruppe (siehe Tabelle 4.1.1).

#### 4.1.1.1 Erhebungsbögen zu den Birken und deren Standorte

Die Bäume wurden zu Dokumentarzwecken photographiert (siehe Appendix). Die Daten des eigens erstellten Erhebungsbogen dienten dazu, die Umweltbelastung

der Pollen abschätzen zu können. Der Score, der die Verkehrsbelastung an einem Standort widerspiegelte, wurde bestimmt (genaue Berechnung siehe Methodenteil 3.3.1). Die Skala von 1-12 Punkten charakterisiert die Standorte anhand ihrer Verkehrsbelastung, wobei zwölf Punkte die höchste Belastung darstellen. Die einzelnen Scores für die Standorte, sortiert nach ihrer Höhe, sind in Tabelle 4.1.2 aufgeführt.

Tabelle 4.1.2: Charakterisierung der Verkehrsexposition an den Standorten - Expositions-lage der einzelnen Standorte angegeben im Punktesystem, sortiert nach ihrer Punktezahl. Je höher die Anzahl der Punkte desto höher die abgeschätzte Verkehrsbelastung, die als Score angegeben ist.

Standortnr.	Straßen- charakteristik	Verkehrslage	Entfernung vom Baum zur nächsten Straße	Entfernung vom Baum zu einer verkehrs- reichen Straße	Score
100	0	0	1	0	1
102	0	0	1	0	1
103	0	0	1	0	1
104	0	0	1	0	1
101	2	1	2	0	5
I	2	1	2	0	5
15	2	2	2	1	7
IV	2	3	3	2	10
33	2	2	3	3	10
5	3	3	3	2	11
II	3	2	3	3	11
32	3	2	3	3	11
III	3	3	3	3	12
22	3	3	3	3	12
V1	3	3	3	3	12
V2	3	3	3	3	12

#### 4.1.1.2 NO<sub>2</sub>-Bestimmung an den Standorten

Stickstoffdioxid diente als Indikator für die Höhe der Verkehrsbelastung und wurde mit Hilfe von Passivsammlern im Frühjahr, zur Birken-Pollen-Flugsaison an ausgewählten Standorten (Nr. 5, 15, 22, 32, 33, IV, V1, 100, 101, 102, 103, 104) gemessen (Palmes et al. 1976). In Tabelle 4.1.3 sind die Stickstoffdioxid-

Konzentrationen, der Mittelwert aus drei Jahren, sortiert nach steigender Konzentration von Stickstoffdioxid aufgelistet.

Tabelle 4.1.3: Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>)-Konzentration an den Birkenstandorten - gemessen mit Passivsammlern; Mittelwert aus dem entsprechenden Messzeitraum.

NO <sub>2</sub>	2002	2003	2004	MW
<b>Standort</b>	[µg/m <sup>3</sup> ]	[µg/m <sup>3</sup> ]	[µg/m <sup>3</sup> ]	[µg/m <sup>3</sup> ]
<b>5 Heckenstallerstraße</b>	30,53	23,96	28,70	27,73
<b>22 Ungererstraße</b>	33,31	21,91	26,50	27,24
<b>33 Mozartstraße</b>	28,87	21,52	25,48	25,29
<b>IV Luise Kiesselbachplatz</b>	24,72	24,42	25,10	24,75
<b>V1 Landsbergerstraße</b>	#	*	22,40	22,40
<b>32 Drygalskiallee</b>	14,74	14,21	20,66	16,54
<b>15 Weinbergstraße</b>	16,35	*	*	16,35
<b>Landbirke 100</b>	#	8,52	8,15	8,33
<b>Landbirke 101</b>	#	7,16	8,09	7,62
<b>Landbirke 102</b>	#	6,89	7,12	7,00
<b>Landbirke 104</b>	#	7,28	6,24	6,76
<b>Landbirke 103</b>	#	5,61	5,99	5,80
* nicht gemessen, # keine Pollen gesammelt				
<b>Messzeiträume:</b>				
<b>Jahr</b>	<b>Standorte</b>	<b>Dauer</b>		
2002	108, 5, 15, 22, 32, 33	16.4. - 23.4.		
2003	108, 5, 22, 32, 33	1.4. - 8.4.		
2003	100, 101, 102, 103, 104	2.4. - 9.4.		
2004	108, 5, 22, 32, 33, 109	20.4 - 27.4.		
2004	100, 101, 102, 103, 104	7.4. - 16.4.		

Die Schwankungen der NO<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen den Jahren an den selben Standorten waren gering. Deswegen wurden aus allen Messungen die jeweiligen Mittelwerte bestimmt. Die Stickstoffdioxidkonzentrationen der ländlichen Regionen reichten von 5,8 µg/m<sup>3</sup> bis 8,33 µg/m<sup>3</sup>. Während an den städtischen Standorten Konzentration von 16,35 µg/m<sup>3</sup> bis 27,73 µg/m<sup>3</sup> erreicht wurden.

#### 4.1.1.3 Umwelt-Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz

Das bayerische Landesamt für Umweltschutz (LfU) misst über mehrere Jahre hinweg verschiedene Luftschadstoffe. Mindestens eine Birke, die in unmittelbarer Nähe zu einer dieser Messstationen in München steht, (Standortnr. I, II, III, IV, V1, V2) wurde beprobt. Hierdurch konnten außer dem Einfluss von NO<sub>2</sub> auf Pollen noch andere Luftschadstoffe einbezogen werden (NO, CO, SO<sub>2</sub>, Feinstaub). Für die Bestimmung des Umwelteinflusses auf den Baum und die Pollenentwicklung bis zur Pollenreife wurden Mittelwerte aus den vom LfU gemessenen Umweltkonzentrationen errechnet. Folglich wurde für die Berechnung der Schadstoffkonzentrationen der Expositionszeitraum vom Vorjahr- Mai bis April des Pollen-Sammel-Jahres berücksichtigt. Die genaue Auflistung der Monatsmittelwerte der Messdaten ist im Appendix dargestellt. Im April ist Pollenflugzeit und die Birkenkätzchen wurden geerntet.

Die Messstation in Johanneskirchen zeigte im Mittel die niedrigste Umweltbelastung an, während am Luise-Kiesselbachplatz hohe Konzentrationen an NO und NO<sub>2</sub> gemessen wurden. Aber auch in der Landsbergerstrasse waren die NO- und NO<sub>2</sub>-Konzentrationen relativ hoch. Hier konnten auch die höchsten CO-Werte gemessen werden. Die Schwefeldioxid-Konzentration aller Standorte stieg in den Wintermonaten stark an. Am Luise-Kiesselbachplatz und der Landsbergerstraße war die Staub-Konzentration, gemessen als PM 10, im Mittel von allen Messstationen am höchsten. In Johanneskirchen wurden zwar die niedrigsten Staubkonzentrationen gemessen, aber oftmals nur geringfügig weniger als in der Landsbergerstraße im Zentrum von München. Von allen LfU Messstationen korrelierten die Umweltparameter CO, NO, NO<sub>2</sub> und Feinstaub direkt signifikant miteinander (siehe Tabelle 4.1.4). Aufgrund dieser Schadstoffbelastungen wurden die Birken-Standorte I, II, III, IV, V1, V2 der „Stadtgruppe“ und der Standort I der „Landgruppe“ zugeordnet.

Tabelle 4.1.4: Umweltmessdaten an den Birken-Standorten; Korrelation der Umweltparameter CO, NO, NO<sub>2</sub> und Feinstaub (LfU-Werte).

Kreuzdiagramm		Kohlenmonoxid CO	Stickstoffoxid NO	Stickstoffdioxid NO <sub>2</sub>	Feinstaub PM 10
<b>Kohlenmonoxid CO</b>	Korrelation nach Pearson Signifikanz (2-seitig) N	1	0,766(*)	0,863(**)	0,846(*)
		9	0,016	0,003	0,016
<b>Stickstoffoxid NO</b>	Korrelation nach Pearson Signifikanz (2-seitig) N	0,766(*)	1	0,969(**)	0,984(**)
		9	0,016	0,000	0,000
<b>Stickstoffdioxid NO<sub>2</sub></b>	Korrelation nach Pearson Signifikanz (2-seitig) N	0,863(**)	0,969(**)	1	0,986(**)
		9	,003	,000	,000
<b>Feinstaub PM 10</b>	Korrelation nach Pearson Signifikanz (2-seitig) N	0,846(*)	0,984(**)	0,986(**)	1
		7	0,016	0,000	0,000

#### 4.1.1.4 Vergleich der Umweltbelastung an den Birken-Standorten

Deutlich zu erkennen war, dass die Passivsammler-Stickstoffdioxid-Konzentrationen sich zwischen den ländlichen Birken-Standorten und den städtischen Standorten um ca. Faktor drei unterschieden. Die Umweltbelastungseinteilung der Standorte mittels des erstellten Scores wurde mit der gemessenen Stickstoffdioxid-Konzentration in Korrelation gebracht (siehe Abbildung 4.1.1). Es zeigte sich, dass die beiden Parameter miteinander positiv korrelierten ( $r = +0,92$ ).

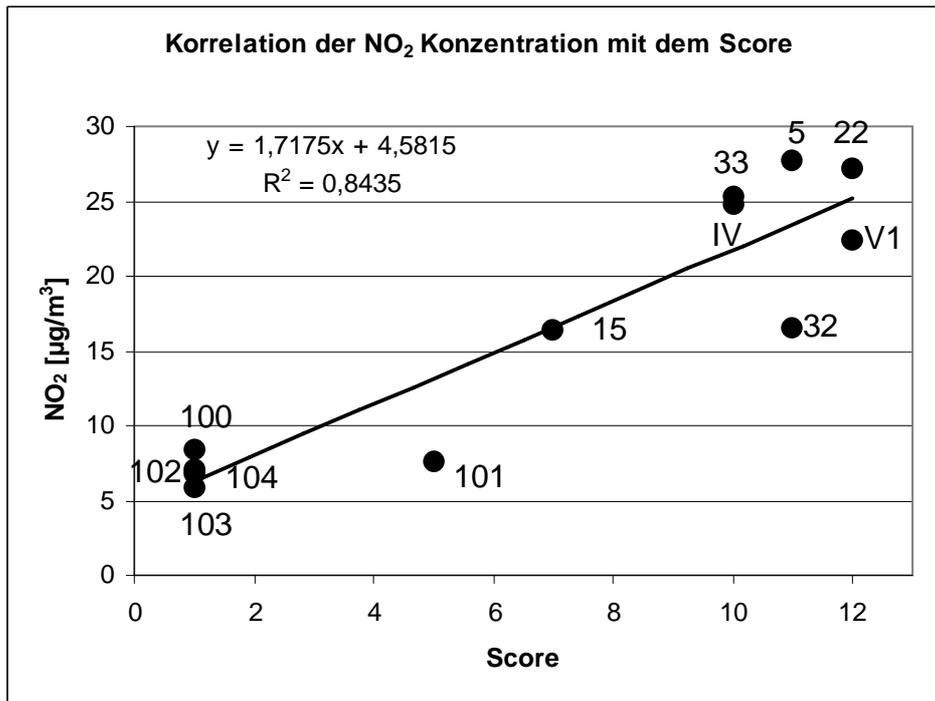


Abbildung 4.1.1: Abschätzung der Schadstoffexpositionen an den Standorten (5, 15, 22, 32, 33, IV, V1, 100, 101, 102, 103, 104) - Korrelation der NO<sub>2</sub>-Konzentration mit dem Score (je höher der Score desto höher die Verkehrsbelastung am Birken-Standort).

Für die Einteilung der Standorte anhand ihrer Umweltbelastung wurden sowohl die Scores, sowie als weitere Indikatoren für Verkehrsbelastung die direkt vor Ort gemessene NO<sub>2</sub> Konzentration und die Messdaten des LfU berücksichtigt. Die Standorte mit einem Punkte-Score von größer sechs wurden in die Stadtgruppe (hohes Verkehrsaufkommen) zugeordnet. Dazu zählten die Standorte Nr. 5, 15, 22, 32, 33, II, III, IV, V1 und V2. Zur Land-Gruppe (niedriges Verkehrsaufkommen) zählten die Standorte Nr. 100 - 104 im Landkreis Freising und die Birke in Johanneskirchen Nr. I.

#### 4.1.2 Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe von *in vivo* exponierten Birkenpollen

Frische Pollen, die zur Zeit des Pollenfluges aus unterschiedlich stark verkehrsbelasteten Standorten gesammelt wurden (2002/2003), wurden auf ihre Bioverfügbarkeit von Leukotrien-ähnlichen Substanzen (PALM<sub>LTB4</sub>), Prostaglandin-ähnlichen Substanzen (PALM<sub>PGE2</sub>), Protein und dem Hauptallergen der Birke Bet v 1 untersucht. Dabei wurden Pollenextrakte von Pollen von unterschiedlich

belasteten Standorte verglichen. Leukotriene und Prostaglandine sind typische Chemoattraktanzien von neutrophilen Granulozyten. In Pollenextrakten wurden den Leukotrienen und Prostaglandinen chemisch ähnliche strukturelle Substanzen mittels HPLC nachgewiesen. Mittels ELISAs von Amersham Bioscience, die generell zur Messung des Leukotrien B<sub>4</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub> in Säugetierzellen eingesetzt werden, wurden die kreuzreagierenden PALMs in den Pollenextrakten quantitativ bestimmt. Für die statistische Absicherung ist die größtmögliche Menge an Standorten eingeflossen. Fehlende Daten sind auf eine nicht ausreichende Pollenmenge zurückzuführen.

Für die *in vivo* exponierten Pollen sind in der Tabelle 4.1.5 die Mittelwerte, die Standardabweichungen und der maximale und minimale gemessene Gehalt der Polleninhaltsstoffe in Abhängigkeit von der Art des Extraktes zusammengefasst. Der Gehalt an Polleninhaltsstoffen im NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Extrakt war für alle Proben um das 2-5 fache höher als im entsprechenden RPMI-Extrakt. Der Appendix zeigt detailliert aufgelistet die Daten zu den einzelnen Standorten. Bei den RPMI-Extrakten fiel besonders die Mozartstraße im Zentrum von München mit doppelt so hohen Werten an PALM<sub>LTB4</sub> (Mittelwert 187,16 pg in 10 mg Pollen) und an PALM<sub>PGE2</sub> (1227,93 pg in 10 mg Pollen) im Jahr 2002 gegenüber den restlichen Standorten auf. Im NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Extrakt hingegen wies der Standort Ungererstraße im Jahr 2002 besonders hohe Werte an PALM<sub>LTB4</sub> (1096 pg in 10 mg Pollen) auf. Besonders hohe Werte an PALM<sub>PGE2</sub> wurden am Standort Dachauerstraße im Jahr 2002 (4735,91 pg in 10 mg Pollen) und 2003 (3770,34 pg in 10 mg Pollen) erhoben. Wie aus den Standardabweichungen in Tabelle 4.1.5 zu erkennen, war die Schwankungsbreite des Gehaltes an Polleninhaltsstoffen sehr groß. Zwischen den von verschiedenen Birken stammenden Pollen gab es erhebliche Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe.

Tabelle 4.1.5: Bioverfügbarkeit der einzelnen Polleninhaltsstoffe der *in vivo* exponierten Pollen: Anzahl (n), Mittelwert, Standardabweichung, maximaler und minimaler Wert.

	<b>Extrakt</b>	<b>n</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standard- abweichung</b>	<b>Maximum</b>	<b>Minimum</b>
<b>PALM<sub>LTB4</sub></b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	24	240,32	260,97	1096,00	49,72
<b>pg pro 10mg Pollen</b>	RPMI	22	59,67	39,72	187,16	16,13
<b>PALM<sub>PGE2</sub></b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	24	1132,17	1244,99	4735,91	70,00
<b>pg pro 10 mg Pollen</b>	RPMI	23	295,83	292,50	1227,93	20,72
<b>Protein</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	24	83,86	24,81	135,68	31,32
<b>µg pro 10 mg Pollen</b>	RPMI	23	43,43	11,90	71,62	27,13
<b>Bet v 1 ng pro 10 mg Pollen</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	24	3425,91	3908,10	15028,00	72,04

#### 4.1.2.1 Unterschiede der Bioverfügbarkeit zwischen den Pollen-Sammeljahren

Birken der Standorte (5, 15, 22, 32, 33, I, II, IV) sind über zwei Jahre beprobt worden. Wie aus Tabelle 4.1.6 hervorgeht, unterschied sich der Bet v 1-Gehalt (gemessen im Ammoniumbicarbonat-Extrakt, optimal zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Bet v 1) signifikant zwischen dem Pollen-Sammeljahr 2002 und dem Jahr 2003. Im Jahr 2003 waren die Werte deutlich um den Faktor 2,6 erhöht.

Tabelle 4.1.6: Vergleich der Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe zwischen den Pollen-Sammeljahren 2002 und 2003 - Gruppenstatistik-Jahresunterschiede: Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), maximaler (Max), minimaler Wert (Min), Anzahl (n), t-Test auf einem Signifikanz-Niveau von  $p = 0,05$ , Korrelationskoeffizient  $r$  mit Signifikanz-Niveau von  $p = 0,05$  (\*).

	Extrakt	Jahr	MW	SD	Max	Min	n	t-Test (lg Werte) p	Korrelations- Koeffizient (lg Werte) r; p
<b>PALM<sub>LTB4</sub></b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2002	345,45	336,40	1096,00	88,00	8	0,103	+0,759; 0,001
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2003	151,31	151,31	502,98	49,72	8		
<b>PALM<sub>LTB4</sub></b>	RPMI	2002	75,29	59,43	187,16	16,13	7	0,719	
	RPMI	2003	55,07	22,89	93,47	28,73	8		
<b>PALM<sub>PGE2</sub></b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2002	1070,05	1582,74	4735,91	70,00	8	0,503	+0,764; 0,001
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2003	1188,71	1188,71	3770,34	88,74	8		
<b>PALM<sub>PGE2</sub></b>	RPMI	2002	323,31	399,83	1227,93	20,72	8	0,828	
	RPMI	2003	238,76	151,08	500,65	74,05	8		
<b>Protein</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2002	94,59	21,36	135,68	67,35	8	0,086	+0,583; 0,018
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2003	28,61	28,61	129,04	31,32	8		
<b>Protein</b>	RPMI	2002	45,84	11,83	68,88	33,25	8	0,993	
	RPMI	2003	46,25	13,96	71,62	35,89	8		
<b>Bet v 1</b>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2002	1938,63	2203,64	5994,66	108,40	8	(*) 0,023	+0,488; 0,22
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	2003	5101,41	5101,41	15028,00	1178,00	8		

Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) betrug +0,488,  $p=0,22$ . Statistisch signifikante Korrelationen bestanden hingegen für PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub> und Protein (siehe Tabelle 4.1.6), die sich jedoch nicht zwischen den beiden Jahren unterschieden. Auch nach der Zusammenführung beider Extrakte zusammengenommen waren keine signifikanten Konzentrations-Unterschiede zwischen den Sammeljahren für die Pollenparameter PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub> und Protein zu verzeichnen.

#### 4.1.2.2 Vergleich der Polleninhaltsstoffe zwischen „Land“- und „Stadt“- Pollen

Der t-Test für den Gehalt der einzelnen Pollenparameter ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Land- und Stadt-Pollen im Jahr 2003 (siehe Tabelle 4.1.7). Auch nach Zusammenführung der beiden Extrakte wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Tabelle 4.1.7: Vergleich der Polleninhaltsstoffe zwischen „Land-“ und „Stadt-Pollen“ (Jahr 2003) - Gruppenstatistik: Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD), maximaler (Max) und minimaler (Min) Wert, t-Test auf einem Signifikanz-Niveau von  $p = 0,05$ .

Polleninhaltsstoffe	Gruppe	Extrakt	Min	Max	MW	SD	n	t-test (lg Werte) p
<b>PALM<sub>LTB4</sub></b> [pg / 10 mg Pollen]	Land	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	63,15	280,96	144,24	80,27	6	0,660
	Stadt	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	49,72	502,98	145,62	146,73	9	
<b>PALM<sub>PGE2</sub></b> [pg / 10 mg Pollen]	Land	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	182,75	3189,46	965,60	1129,99	6	0,650
	Stadt	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	88,74	3770,34	1153,29	1108,05	9	
<b>Protein</b> [µg / 10 mg Pollen]	Land	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	56,03	102,64	78,6033	17,53	6	0,577
	Stadt	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	31,32	129,04	74,14	28,26	9	
<b>Bet v 1</b> [ng / 10 mg Pollen]	Land	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	72,04	11712,00	3355,47	4324,32	6	0,256
	Stadt	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	768,00	15028,00	5105,33	4648,62	9	
<b>PALM<sub>LTB4</sub></b> [pg / 10 mg Pollen]	Land	RPMI	25,60	96,52	53,82	30,94	6	0,951
	Stadt	RPMI	22,42	93,47	51,41	24,04	9	
<b>PALM<sub>PGE2</sub></b> [pg / 10 mg Pollen]	Land	RPMI	49,86	857,83	327,17	328,40	6	0,952
	Stadt	RPMI	74,05	500,65	250,50	155,60	9	
<b>Protein</b> [µg / 10 mg Pollen]	Land	RPMI	29,16	49,49	39,48	7,59	6	0,588
	Stadt	RPMI	27,13	71,62	43,91	14,61	9	

Wie aus der Abbildung 4.1.2 ersichtlich, fielen einige Standorte mit besonders hohem Gehalt für bestimmte Polleninhaltsstoffe in ihrer Gruppe auf. Die Pollen vom Standort II\_2003 (Dachauerstraße) hatten besonders hohe Werte an PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub> und Protein im Ammoniumbicarbonat-Extrakt. Auch die Pollen des Standortes 33\_2003 (Mozartstraße) zeigten einen deutlich höheren Gehalt von PALM<sub>LTB4</sub>. Im NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Extrakt der Standorte 103\_2003 (Landkreis Freising) und 22\_2003 (Ungererstraße) konnte besonders viel PALM<sub>PGE2</sub> nachgewiesen werden. Im RPMI-Extrakt war der Proteingehalt der Pollen von den Standorten 32\_2003 (Drygalskieallee) und 33\_2003 (Mozartstraße) besonders hoch. Im Vergleich zu den anderen Landbirken hat Birke Nr. I\_2003 (Johanneskirchen) relativ viel Bet v 1 (siehe Abbildung 4.1.2).

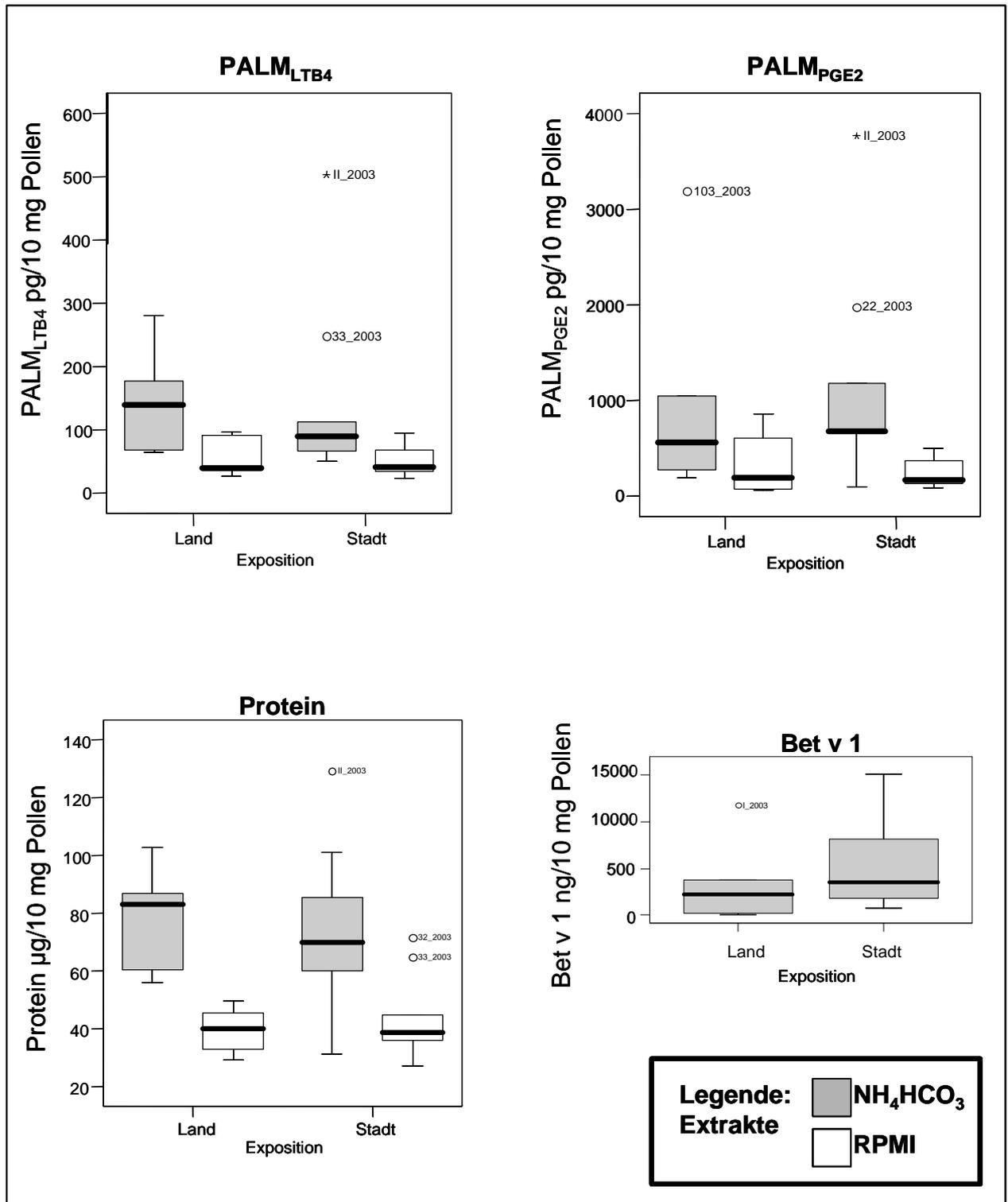


Abbildung 4.1.2: Vergleich der Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe der „Land-“ und „Stadt-Pollenextrakte“ in Abhängigkeit vom Extrakt. (nLand = 6, nStadt = 9, Pollen gesammelt 2003) - Boxplotdiagramme: Dicker Strich Median, untere Grenze der Box 25% Perzentil, obere Grenze der Box 75% Perzentil. Die ober- und unterhalb der Box stehenden Querstriche geben den größten und kleinsten Wert an. Extrem Werte: ° Werte: Werte, die mehr als das 1,5fache der Länge der Box entfernt liegen, \* Werte: Werte, die mehr als das 3fache der Länge der Box entfernt liegen.

#### **4.1.2.3 Einfluss der Umweltparameter auf die Bioverfügbarkeit von Polleninhaltsstoffen**

Die Verkehrsbelastung der Standorte der Birken und damit die Expositionsbedingungen der Birkenpollen wurden charakterisiert. Die Birken standen entweder nahe den Messstationen des LfU oder es wurde Stickstoffdioxid als Indikator für Kraftfahrzeug-Verkehr mittels Passivsammler bestimmt. Zusätzlich wurde mittels des Verkehrsscores (siehe Punkt 4.1.1.1) die Verkehrssituation an den Standorten eingeschätzt. Weder im Ammoniumbicarbonat-Extrakt noch im RPMI-Extrakt korrelierten die Polleninhaltsstoffe signifikant mit den Umweltparametern. Die einzelnen Korrelationskoeffizienten nach Pearson sind in Tabelle 4.1.8 für den Ammoniumbicarbonat-Extrakt und in Tabelle 4.1.9 für den RPMI Extrakt zu entnehmen.

Tabelle 4.1.8: Zusammenhang der Polleninhaltsstoffe mit den Umweltparametern. Korrelationskoeffizienten nach Pearson im  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Extrakt. Messwerte der LfU (von Mittelwerten aus den Konzentrationen der Schadstoffe der Monate Mai 2001 - April 2002 für das Pollen-Sammeljahr 2002 bzw. Mai 2002 - April 2003 für das Pollensammeljahr 2003), (langer Einfluss der Schadstoffe auf den Baum und die Pollenentwicklung bis zur Sammlung); Stickstoffdioxidbestimmung mittels Passivsammler zur Pollenflugsaison (Einfluss des Schadstoffes direkt zur Pollensammlung); Score zur Abschätzung der Verkehrsbelastung.

Kreuzdiagramm		Ig PALM <sub>LTB4</sub>	Ig PALM <sub>PGE2</sub>	Ig Protein	Ig Bet v 1
<b>Schwefeldioxid</b>	Korrelation nach Pearson	0,399	0,204	0,186	-0,216
	Signifikanz (2-seitig)	0,287	0,598	0,632	0,577
	N	9	9	9	9
<b>Kohlenmonoxid</b>	Korrelation nach Pearson	-0,387	0,151	0,031	-0,141
	Signifikanz (2-seitig)	0,304	0,697	0,936	0,718
	N	9	9	9	9
<b>Stickstoffoxid</b>	Korrelation nach Pearson	-0,573	-0,356	-0,433	0,272
	Signifikanz (2-seitig)	0,107	0,347	0,244	0,478
	N	9	9	9	9
<b>Stickstoffdioxid</b>	Korrelation nach Pearson	-0,544	-0,217	-0,354	0,163
	Signifikanz (2-seitig)	0,130	0,575	0,350	0,676
	N	9	9	9	9
<b>Feinstaub</b>	Korrelation nach Pearson	-0,465	-0,088	-0,323	0,021
	Signifikanz (2-seitig)	0,293	0,852	0,479	0,964
	N	7	7	7	7
<b>Stickstoffdioxid Passivsammler</b>	Korrelation nach Pearson	0,415	0,070	0,219	-0,013
	Signifikanz (2-seitig)	0,110	0,796	0,415	0,962
	N	16	16	16	16
<b>Score</b>	Korrelation nach Pearson	0,126	0,082	0,134	0,132
	Signifikanz (2-seitig)	0,557	0,704	0,532	0,538
	N	24	24	24	24

Tabelle 4.1.9: Zusammenhang der Polleninhaltsstoffe mit den Umweltparametern. Korrelationskoeffizienten nach Pearson im RPMI-Extrakt. Messwerte der LfU von Mittelwerten aus den Konzentrationen der Schadstoffe der Monate Mai 2001 - April 2002 für das Pollen-Sammeljahr 2002 bzw. Mai 2002 - April 2003 für das Pollensammeljahr 2003 (langer Einfluss der Schadstoffe auf den Baum und die Pollenentwicklung bis zur Sammlung); Stickstoffdioxidbestimmung mittels Passivsammler zur Pollenflugsaison (Einfluss des Schadstoffes direkt zur Pollensammlung); Score zur Abschätzung der Verkehrsbelastung.

Kreuzdiagramm		Ig PALM <sub>LTB4</sub>	Ig PALM <sub>PGE2</sub>	Ig Protein
<b>Schwefeldioxid</b>	Korrelation nach Pearson	0,283	0,162	0,519
	Signifikanz (2-seitig)	0,497	0,702	0,187
	N	8	8	8
<b>Kohlenmonoxid</b>	Korrelation nach Pearson	-0,361	0,195	-0,013
	Signifikanz (2-seitig)	0,380	0,644	0,976
	N	8	8	8
<b>Stickstoffoxid</b>	Korrelation nach Pearson	-0,565	-0,287	0,256
	Signifikanz (2-seitig)	0,145	0,490	0,541
	N	8	8	8
<b>Stickstoffdioxid</b>	Korrelation nach Pearson	-0,590	-0,185	0,118
	Signifikanz (2-seitig)	0,124	0,661	0,782
	N	8	8	8
<b>Feinstaub</b>	Korrelation nach Pearson	-0,570	0,001	0,217
	Signifikanz (2-seitig)	0,237	0,999	0,680
	N	6	6	6
<b>Stickstoffdioxid Passivsammler</b>	Korrelation nach Pearson	0,192	0,078	0,193
	Signifikanz (2-seitig)	0,493	0,775	0,473
	N	15	16	16
<b>Score</b>	Korrelation nach Pearson	-0,094	-0,115	0,251
	Signifikanz (2-seitig)	0,676	0,600	0,248
	N	22	23	23

#### 4.1.3 Nachweis biologischer Aktivität im Pollenextrakt der *in vivo* exponierten Pollen

##### 4.1.3.1 Wechselwirkung von neutrophilen Granulozyten mit Birkenpollenextrakten als Chemoattraktanz im Migrationsassay

Um die chemotaktische Wirkung von Pollenextrakten auf humane neutrophile Granulozyten zu untersuchen, wurden Migrationsassays durchgeführt. Von verschiedenen nicht atopischen Spendern wurden frisch isolierte neutrophile Granulozyten eingesetzt. Um die Spendervarianz auszugleichen und somit die einzelnen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde in jedem Versuch

---

als Positivkontrolle Leukotrien B<sub>4</sub>, das stärkste Chemoattraktanz für neutrophile Granulozyten, eingesetzt, anhand dessen die Migrationsindizes standardisiert wurden.

Die Extrakte der unterschiedlich exponierten Birkenpollen wurden bezüglich ihres chemotaktischen Einflusses auf neutrophile Granulozyten analysiert und verglichen. Es war zu beobachten, dass die standardisierten Migrationsindizes normalverteilt sind (Abbildung 4.1.3). Eine chemotaktische Wirkung der Pollenextrakte von 0,37 (standardisierter Migrationsindex) wurde am häufigsten festgestellt.

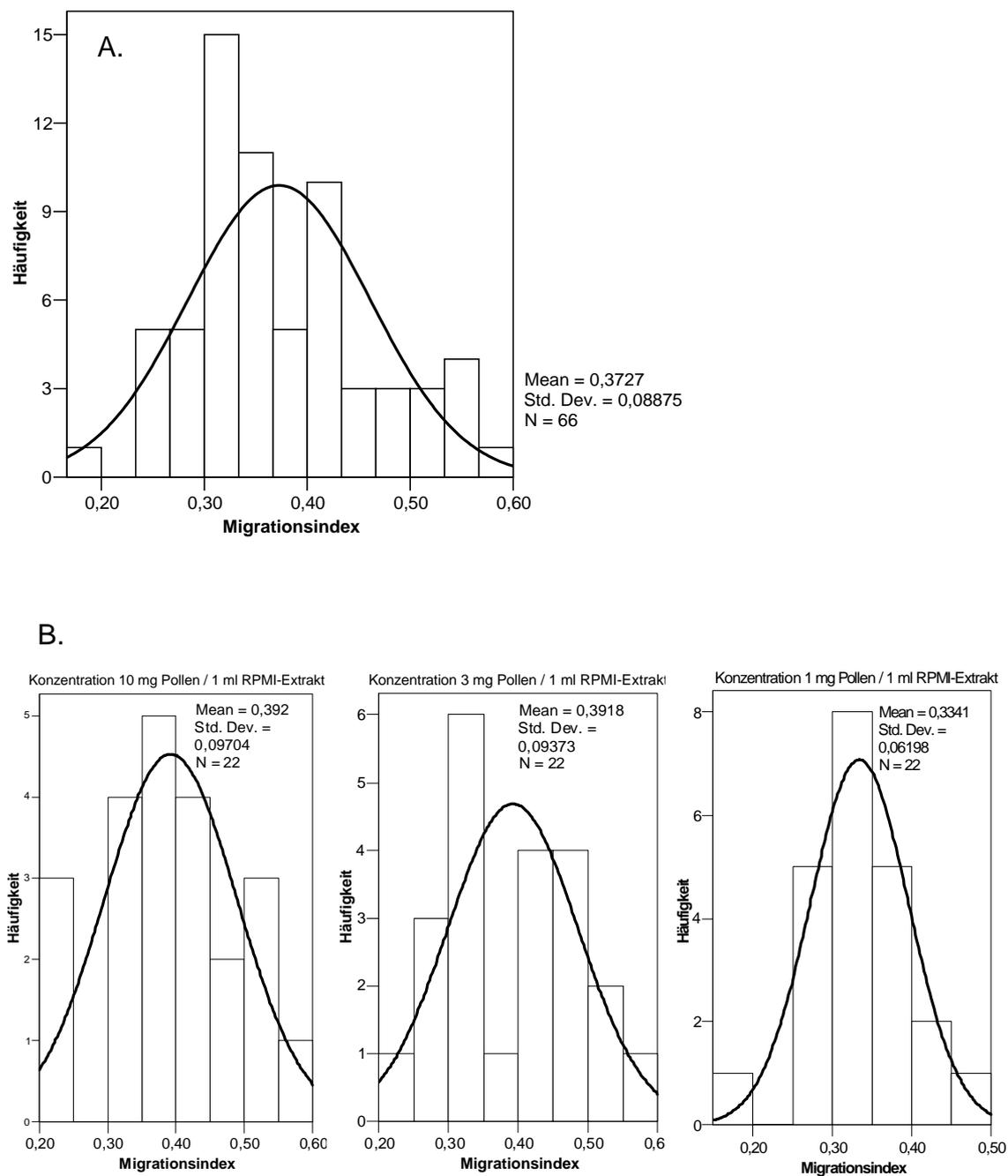


Abbildung 4.1.3 A. Verteilung der standardisierten Migrationsindizes, ausgelöst durch die chemotaktische Wirkung der Pollenextrakte auf humane neutrophile Granulozyten mit darüber projizierter Normalkurve. B. Verteilung der standardisierten Migrationsindizes, ausgelöst durch die chemotaktische Wirkung der Pollenextrakte auf humane neutrophile Granulozyten in Abhängigkeit der Pollenkonzentrationen.

Die Wirkung der Pollenextrakte auf humane neutrophile Granulozyten war konzentrationsabhängig, wobei es bei manchen Standorten bei hohen Konzentrationen an Pollen im Extrakt zu einem Abfall des Migrationsindex kam (Standorte 5\_02, 5\_03, 22\_02, 22\_03, 32\_03, 33\_03, I\_03, II\_03, IV\_02, V1\_03, V2\_03). In Tabelle 4.1.10 sind die einzelnen standardisierten Migrationsindizes der Standorte in Abhängigkeit der eingesetzten Pollenkonzentration aufgelistet. Bei einer Pollenkonzentration von 1 mg Pollen pro 1 ml RPMI-Extrakt fiel der Standort Nr. 15 im Sammel-Jahr 2002 auf, da hierbei der höchste Migrationsindex von 0,49 bei dieser Pollenkonzentration erreicht wurde. Am geringsten war der Einfluss des Pollenextraktes von Standort Nr. 100 mit einem Migrationsindex von 0,19. Bei einer Pollenkonzentration von 3 mg Pollen pro 1 ml RPMI-Extrakt sind generell die höchsten Aktivierungen von neutrophilen Granulozyten erzielt worden. Der Standort Nr. 22 im Jahr 2002 hat mit einem Migrationsindex von 0,65 das höchste Aktivierungspotential von allen Extrakten. Der niedrigste Migrationsindex zeigte sich bei einer Pollenkonzentration von 3 mg Pollen pro 1 ml RPMI-Extrakt bei dem Standort Nr. II im Jahr 2002 (Migrationsindex 0,27). Bei der höchsten eingesetzten Pollenkonzentration von 10 mg Pollen pro ml RPMI-Extrakt erreichte der Pollenextrakt von Standort Nr. 15\_03 mit einem Migrationsindex von 0,6 die stärkste Zellaktivierung. Bei den Pollenextrakten der Standorte Nr. II\_03 und V1\_03 wurde die niedrigste chemotaktische Wirkung gemessen (Migrationsindizes von 0,24).

Tabelle 4.1.10: Einfluss der Pollenextrakte auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay - Standardisierte Migrationsindizes der Pollen-Extrakte der Standorte auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay in Abhängigkeit von der eingesetzten Pollenkonzentration (n=2).

Standort	Nr.	Jahr	Mittelwert Migrationsindex		
			1 mg Pollen	3 mg Pollen	10 mg Pollen
Heckenstallerstraße	5_02	2002	0,39	0,47	0,45
Heckenstallerstraße	5_03	2003	0,41	0,54	0,41
Weinbergerstraße	15_02	2002	0,49	0,50	0,54
Weinbergerstraße	15_03	2003	0,37	0,57	0,60
Ungererstraße	22_03	2003	0,42	0,52	0,38
Drygalskiallee	32_02	2002	0,38	0,47	0,51
Drygalskiallee	32_03	2003	0,35	0,43	0,42
Mozartstraße	33_02	2002	0,36	0,41	0,41
Mozartstraße	33_03	2003	0,36	0,46	0,36
Johanneskirchen	I_02	2002	0,31	0,41	0,54
Johanneskirchen	I_03	2003	0,33	0,41	0,47
Dachauerstraße	II_02	2002	0,33	0,27	0,33
Dachauerstraße	II_03	2003	0,31	0,35	0,24
Luise-Kiesselbachplatz	IV_02	2002	0,31	0,39	0,34
Luise-Kiesselbachplatz	IV_03	2003	0,27	0,31	0,40
Landsbergerstraße	V1_03	2003	0,29	0,31	0,24
Landsbergerstraße	V2_03	2003	0,30	0,31	0,25
Landkreis_Freising	100_03	2003	0,19	0,24	0,36
Landkreis_Freising	101_03	2003	0,28	0,33	0,36
Landkreis_Freising	102_03	2003	0,29	0,30	0,35
Landkreis_Freising	103_03	2003	0,31	0,30	0,31
Landkreis_Freising	104_03	2003	0,32	0,32	0,35

#### 4.1.3.2 Korrelationen der Pollen-assoziierten Lipidmediatoren mit dem Migrationsindex

Pollen setzen Substanzen frei, die chemotaktisch auf Granulozyten wirken. Im ELISA wurden Kreuzreaktivitäten der Pollenextrakte mit dem LTB<sub>4</sub>-ELISA und dem PGE<sub>2</sub>-ELISA gemessen. Es bestand jedoch keine signifikante Korrelation des standardisierten Migrationsindexes mit dem im ELISA gemessenen Gehalt an PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub> oder deren Summe.

Tabelle 4.1.11: Korrelation der Migrationsindizes mit den Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub>, PALMs).

Kreuzdiagramm		Ig PALM <sub>LTB4</sub>	Ig PALM <sub>PGE2</sub>	Ig PALMs
<b>standardisierter Migrationsindex</b>	Korrelation nach Pearson	- 0,166	- 0,308	- 0,286
	Signifikanz (2-seitig)	0,461	0,164	0,197
	N	22	22	22

#### 4.1.3.3 Unterschiede zwischen den Landbirken- und den Stadtbirken-Pollenextrakten in Bezug auf ihr Potential neutrophile Granulozyten zu aktivieren

Für den Vergleich der von Landbirken und Stadtbirken gesammelten Pollen wurden zwei Gruppen gebildet. In die statistische Analyse sind nur die Standorte mit einbezogen worden, bei denen im Jahr 2003 Pollen in ausreichender Menge vorhanden waren. Die Standorte I, 100, 101, 102, 103 und 104 bildeten die Landgruppe. Die Standorte 5, 15, 22, 32, 33, IV, V1, und V2 wurden zu der höher umweltbelasteten Stadtgruppe zusammengefasst.

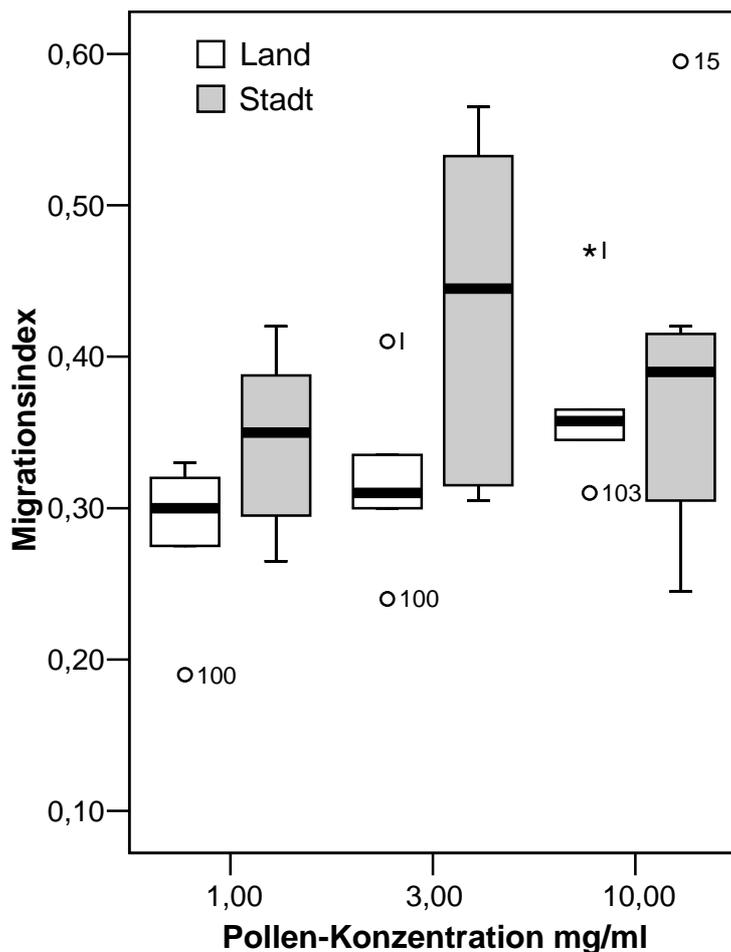


Abbildung 4.1.4: Einfluss der Pollenextrakte auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay - Vergleich der Migrationsindizes zwischen „Landpollen-“ (n = 6) und „Stadtpollen-Extrakten“ (n = 8) des Sammeljahres 2003 je nach der Menge der eingesetzten Pollen (1, 3 und 10 mg) pro 1 ml Medium.

Die Mediane der Migrationsindizes der „Landpollen-Extrakte“ waren bei allen untersuchten Pollenkonzentrationen niedriger im Vergleich zu den Migrationsindizes ausgelöst durch die „Stadtpollen-Extrakte“. Manche Pollenextrakte einzelner Standorte hoben sich deutlich von dem Median ihrer Gruppe ab. Pollen der Standorte Nr. 100 und Nr. 103 zeigten ein im Vergleich zur gesamten Land-Gruppe geringe chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten auf. Die Standorte Nr. 1 und 15 hingegen hatten für ihre jeweiligen Gruppen eine erhöhte chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten. „Stadtpollen-Extrakte“ von 10 mg Pollen/ml Medium führten zu keiner weiteren Erhöhung der Migrationsindizes, stattdessen sanken die Migrationsindizes ab. Bei den „Landpollen-Extrakten“ hingegen war eine Steigerung der Aktivierung der

neutrophilen Granulozyten bei einer Pollenkonzentration von 10 mg noch möglich. Die detaillierten Daten sind Tabelle 4.1.12 dargestellt.

Tabelle 4.1.12: Vergleich des Einflusses der Pollenextrakte auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay: Migrationsindizes-Mittelwerte (MW MI) mit ihrer Standardabweichung (SD MI) der Landgruppe und der Stadtgruppe in Abhängigkeit der Pollenkonzentration.

	Konzentration Pollen in mg	MW MI	SD MI	Anzahl
<b>Land</b>	1	0,286	0,0510	6
	3	0,318	0,0557	6
	10	0,368	0,0539	6
<b>Stadt</b>	1	0,340	0,0529	8
	3	0,423	0,1052	8
	10	0,367	0,1139	8

Um die zwei Gruppen der „Landpollen“ und „Stadtpollen“ statistisch zu vergleichen, wurde der t-Test durchgeführt (siehe Tabelle 4.1.13).

Tabelle 4.1.13: t-Test zum Vergleich von Landgruppe und Stadtgruppe auf einem Signifikanz-Niveau von  $p \leq 0,05$ .

		Levene-Test der Varianzgleichheit		t-Test für die Mittelwertgleichheit					95% Konfidenzintervall der Differenz	
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	Untere	Obere
Migrationsindex	Varianzen sind gleich	4,492	,040	-2,375	40	,022	-,06243	,02628	-,11555	-,00931
	Varianzen sind nicht gleich			-2,534	38,882	,015	-,06243	,02464	-,11228	-,01259

Die beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant im t-Test mit einem  $p=0,015$ , wobei die signifikanten Unterschiede am deutlichsten sind bei einer Pollenkonzentration von 3 mg.

## 4.2 *In vitro* Expositionen von Birken- und Graspollen

### 4.2.1 Funktionsüberprüfung der Expositionsanlage

Für die *in vitro* Pollenexpositionen wurden zwei Wirbelschichtreaktoren eingesetzt (siehe Abbildung 4.2.1). Mit diesen Expositionsgefäßen wurden verschiedene Pollenarten unter standardisierten Bedingungen mit Schadstoffen exponiert. Diese *in vitro* Expositionen ermöglichten es, den Einfluss von Luftschadstoffen auf Pollen, zu analysieren. In Vorversuchen wurden zuerst die optimalen Einstellungen der Expositionsbedingungen für *Betula*- und *Phleum*-Pollen ermittelt, um während des Versuches eine Pollenwirbelschicht aufrecht erhalten zu können. Die Abbildung 4.2.1 zeigt die gelbe Wirbelschicht in den Wirbelschichtreaktoren. In Tabelle 4.2.1 sind die optimierten Expositionsbedingungen dargestellt.



Abbildung 4.2.1: *in vitro*-Expositionen von Pollen - Wirbelschichtreaktoren mit Pollen beladen.

Tabelle 4.2.1: Expositionsbedingungen für die *in vitro* Exposition von Pollen mit Schadstoffen.

Pollenart (*)	synthetische Luft angereichert mit (+)	Relative Luftfeuchte %rF	Luftstrom	Dauer
<i>Betula verrucosa</i>	Schwefeldioxid 13 mg/m <sup>3</sup>	30, 50, 70,	1000 ml/min	16 h
<i>Betula verrucosa</i>	Schwefeldioxid 13 mg/m <sup>3</sup>	30, 50, 70,	1000 ml/min	16 h
<i>Betula verrucosa</i>	Partikel NST 1648 Ø 3 µm, 200 µg/m <sup>3</sup>	50	1000 ml/min und 500 ml/min über Partikelgenerator	4 h
<i>Phleum pratense</i>	Partikel NST 1648 Ø 3 µm, 200 µg/m <sup>3</sup>	50	1000 ml/min und 500 ml/min über Partikelgenerator	6 h
<i>Phleum pratense</i>	Toluol/m-Xylol Im Verhältnis 3:2, 1MAK (bezogen auf Toluol)	50	1000 ml/min	6 h

(\*) 2 g Pollen pro Wirbelschichtreaktor

(+) als Kontrolle wurde reine synthetische Luft mit einem Luftstrom von 1000 ml/min verwendet.

*Betula*-Pollen wurden mit Schwefeldioxid bei unterschiedlicher relativer Luftfeuchte (30%, 50%, 70%) exponiert. Zusätzlich wurde der Einfluss von Feinstaubpartikeln auf *Phleum*- und *Betula*- Pollen untersucht. Hierzu wurde vorab die Partikelkonzentration im Reaktor durch Anschließen eines Partikel-Analyzer bestimmt. In Abbildung 4.2.2 ist die Partikelverteilung für die *in vitro* Exposition von *Betula*-Pollen und in Abbildung 4.2.3 für *Phleum*-Pollen dargestellt. Eine Partikelkonzentration von 200 µg/m<sup>3</sup> wurde generiert.

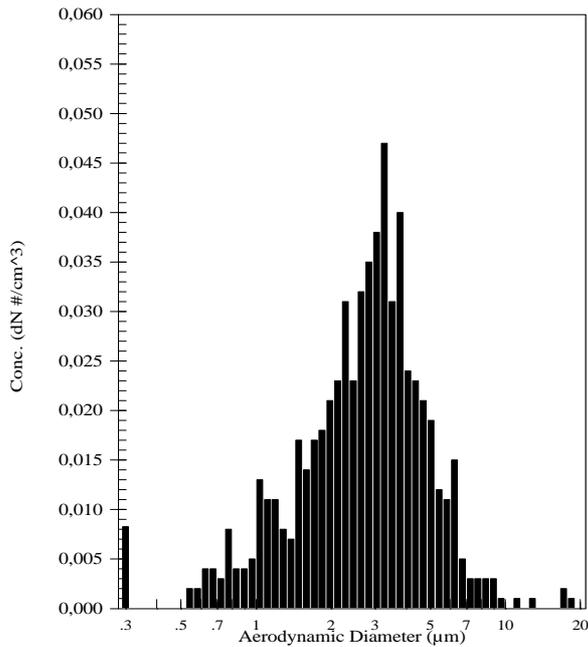


Abbildung 4.2.2 Partikelverteilung unmittelbar vor dem Versuchsstart der Feinstaubpartikel-Exposition von *Betula*-Pollen.

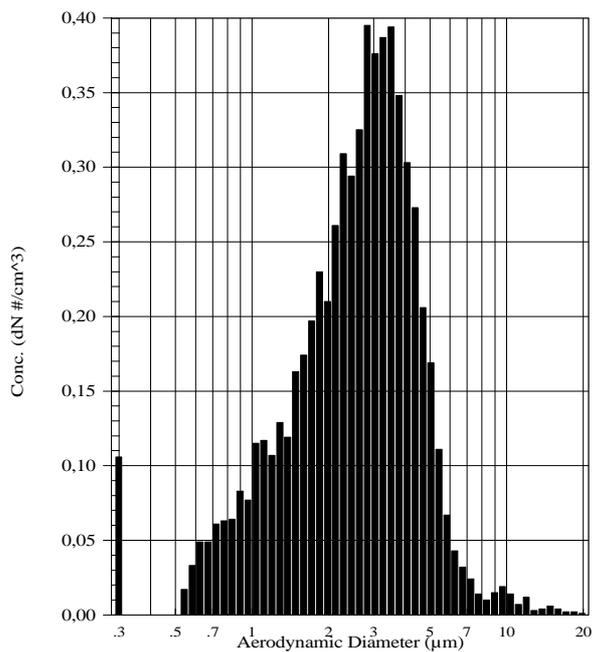


Abbildung 4.2.3 Partikelverteilung unmittelbar vor dem Versuchsstart der Feinstaubpartikel-Exposition von *Phleum*-Pollen.

Neben der Feinstaubpartikel-Exposition wurden die *Phleum*-Pollen mit einem 3:2 Verhältnis von Toluol und m-Xylol exponiert. Dieses Verhältnis entspricht dem von verkehrsbelasteter Luft. Bereits zwei Tage vorher wurde die Expositionsanlage mit

dem Toluol/m-Xylol-Gemisch (VOC) gesättigt und die gewünschte Konzentration mittels VOC-Generator eingestellt. Zum quantitativen Nachweis der VOC-Prüfgaskonzentration in der Expositions-kammer wurden definierte Probenvolumina auf Aktivkohleröhrchen mit einer Pumpe angereichert. Die Analyten wurden anschließend mit Benzylalkohol desorbiert und gaschromatographisch analysiert. Mit Hilfe einer Kalibrierungskurve für Toluol und m-Xylol wurde die Konzentration an Toluol und m-Xylol in der Expositionsanlage bestimmt.

Die Trennung des VOC-Gemisches erfolgte entsprechend ihrer Siedepunkte im Gaschromatographen (siehe Abbildung 4.2.4). Die Trennung erfolgte bei 100°C. Mit diesem optimierten Temperaturprogramm wurde eine klare Trennung der Analyten erreicht. Das leichter flüchtige Toluol erschien hierbei als erster Peak nach einer Retentionszeit von 3,35 min. Nach einer Retentionszeit von 4,46 min wurde m-Xylol von der Säule gelöst. Bei dem dritten Peak (6,58 min) handelte es sich um eine Verunreinigung des Benzylalkohols (siehe Abbildung 4.2.4). Die Säule des Gaschromatographen wurde durch eine anschließende Aufheizphase von Benzylalkohol gereinigt.

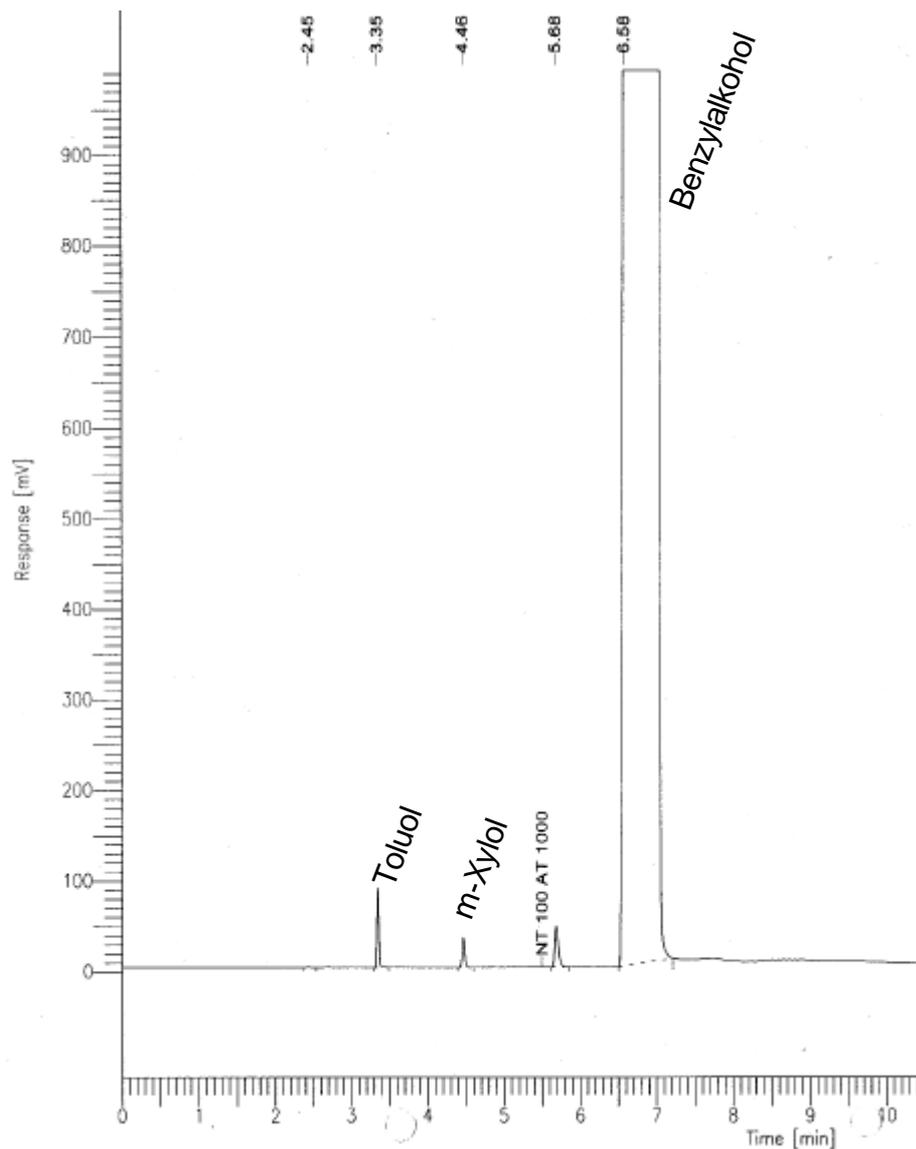


Abbildung 4.2.4: Konzentrationsbestimmung - Chromatogramm von Toluol und m-Xylol desorbiert mit Benzylalkohol.

Während des eigentlichen Expositions-Versuches wurde die Toluol- und m-Xylol-Konzentration mittels Gaschromatographen mit einem *online* Verfahren kontrolliert. Dazu wurde mit einer Hamiltonspritze oben aus der Abluft des Reaktors 100  $\mu\text{l}$  Gas entnommen und in den Gaschromatographen eingespritzt. Die Reproduzierbarkeit der Analyse wurde durch mehrmalige kurz hintereinander folgende Einspritzungen überprüft. Abbildung 4.2.5 zeigt die hintereinander folgende zweimalige Einspritzung des Gases. Die Flächen unter den Kurven sind für die jeweiligen Analyten konstant und zeigen deren Konzentrationen an.

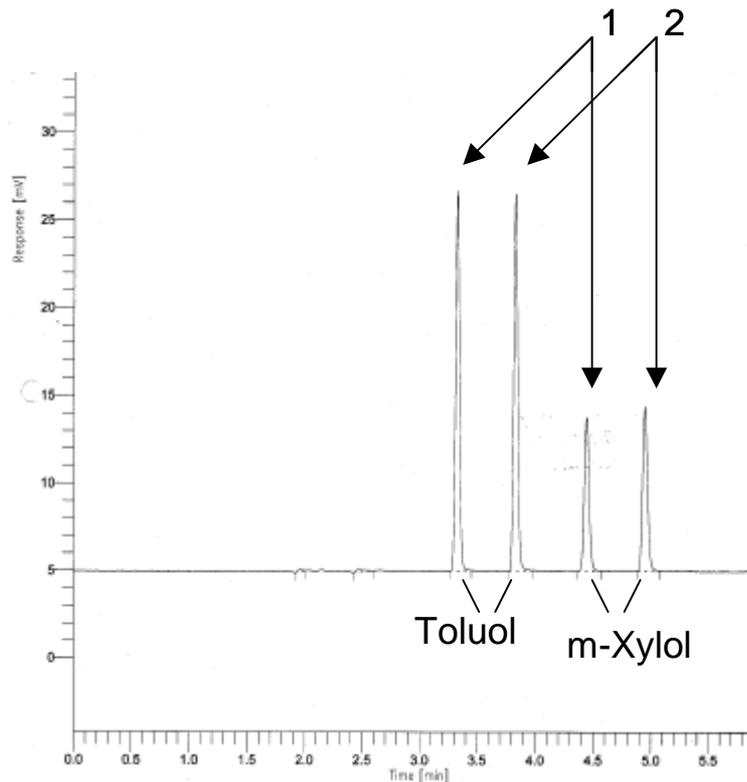


Abbildung 4.2.5: online Überwachung - Chromatogramm für Toluol und m-Xylol. Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Analyse durch zweimaliges Einspritzen (1 und 2) von 100  $\mu$ l Gas.

#### 4.2.2 Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe von *in vitro* exponierten

##### Pollen

Es wurden sowohl *Betula*- wie auch *Phleum*-Pollen unter verschiedenen Schadstoff-Bedingungen *in vitro* im Wirbelschichtreaktor exponiert und auf ihre Bioverfügbarkeit von Leukotrien-ähnlichen Substanzen (PALM<sub>LTB<sub>4</sub></sub>), Prostaglandin-ähnlichen Substanzen (PALM<sub>PGE<sub>2</sub></sub>), Protein und dem Hauptallergen der Birke Bet v 1 untersucht. Dabei wurden Pollenextrakte, hergestellt aus Pollen der jeweiligen Kontrollexposition (mit synthetischer Luft) mit den Pollen die unter Zustrom von Schadstoffen (SO<sub>2</sub>, Partikel, VOC) exponiert wurden, verglichen. Leukotriene und Prostaglandine sind typische Chemoattraktanzien von neutrophilen Granulozyten. In Pollenextrakten wurden den Leukotrienen und Prostaglandinen chemisch ähnliche strukturelle Substanzen mittels HPLC nachgewiesen. Mittels ELISAs von Amersham Bioscience, die generell zur Messung des Leukotrien B<sub>4</sub> und

Prostaglandin E<sub>2</sub> in Säugetierzellen eingesetzt werden, wurden die kreuzreagierenden PALMs in den Pollenextrakten quantitativ bestimmt (siehe Tabelle 4.2.2 und Tabelle 4.2.3).

#### **4.2.3 Einfluss anthropogener Stoffen (SO<sub>2</sub>, Partikel, VOC) auf die Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe**

Der Einfluss von Umweltschadstoffen (SO<sub>2</sub>, Partikel, VOC) wurde mittels *in vitro* Expositionen im Wirbelschichtreaktor überprüft. In Tabelle 4.2.2 und Tabelle 4.2.3 sind die einzelnen Daten zu dem Gehalt der Polleninhaltsstoffe bezogen auf 10 mg Pollen aufgelistet. Ein signifikanter Einfluss der Schadstoffe auf die Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe war ausschließlich bei dem vier Stunden NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Extrakt zu verzeichnen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Proteingehalt bei Schwefeldioxid exponierten *Betula*-Pollen bei einer relativen Luftfeuchte von 30%. So lag der Proteingehalt der mit Schwefeldioxid exponierten Pollen um 16% niedriger als bei den Kontroll-Pollen. Unter Einfluss von 70% Luftfeuchte und Schwefeldioxid stieg der Bet v 1 Gehalt signifikant um 17%. Die Partikelbelastung zeigte einen signifikanten Einfluss sowohl auf PALM<sub>PGE2</sub> als auch auf den Allergengehalt Bet v 1: Der Gehalt an PALM<sub>PGE2</sub> fiel um 32% bei den belasteten Pollen. In den mit Partikeln exponierten Pollen fiel der Bet v 1 Gehalt um 7%. Bei Gräserpollen bewirkten flüchtige organische Substanzen (VOCs) eine 18%ige signifikante Zunahme des Proteingehaltes (Tabelle 4.2.4).

Tabelle 4.2.2: Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe im RPMI Extrakt - Konzentrationen der Pollensubstanzen in 10 mg *in vitro* exponierte *Betula*- und *Phleum*-Pollen: Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub>), Protein und Allergen Bet v 1.

Art	Versuch	rel. Feuchte	PALM <sub>LTB4</sub>		PALM <sub>PGE2</sub>		Protein		Bet v 1	
			MW [pg]	SD [pg]	MW [pg]	SD [pg]	MW [µg]	SD [µg]	MW [ng]	SD [µg]
		% rF								
<i>Betula</i>	Kontrolle	50% rF	119,94	5,19	2188,51	683,61	121,81	16,07	21909,33	257,78
<i>Betula</i>	SO <sub>2</sub>	50% rF	103,34	16,74	1255,56	139,63	135,81	2,22	22186,67	2528,38
<i>Betula</i>	Kontrolle  V	30% rF	116,93	27,64	2955,68	509,62	136,65	1,67	20202,67	1320,00
<i>Betula</i>	SO <sub>2</sub>  V	30% rF	114,12	14,74	2055,84	92,04	114,22	8,40	17226,67	1501,24
<i>Betula</i>	Kontrolle V	70% rF	97,04	12,77	2078,26	1066,71	133,89	8,03	20746,67	757,86
<i>Betula</i>	SO <sub>2</sub> V	70% rF	93,79	11,15	2305,94	551,06	126,37	31,94	24339,33	484,34
<i>Betula</i>	VIII Kontrolle	50% rF	88,93	3,69	1717,49	337,14	108,57	29,46	24638,67	287,42
<i>Betula</i>	VIII Partikel	50% rF	96,69	26,93	1160,15	116,58	130,11	43,41	22837,33	590,24
<i>Phleum</i>	VII Kontrolle	50% rF	443,82	265,00	383,38	119,45	210,45	19,08		
<i>Phleum</i>	VII Partikel	50% rF	497,30	104,54	546,13	272,64	191,00	2,15		
<i>Phleum</i>	IX Kontrolle	50% rF	305,69	38,42	816,44	205,83	183,16	11,12		
<i>Phleum</i>	IX VOC	50% rF	304,83	22,36	601,77	124,04	215,73	17,30		

Tabelle 4.2.3: Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe im NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> Extrakt- Konzentrationen der Pollensubstanzen in 10 mg *in vitro* exponierte *Betula*- und *Phleum*-Pollen: Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub>) und Protein.

Art	Versuch	rel. Luftfeuchte	PALM <sub>LTB4</sub>		PALM <sub>PGE2</sub>		Protein	
			MW [pg]	SD [pg]	MW [pg]	SD [pg]	MW [µg]	SD [µg]
		% rF						
<i>Betula</i>	III Kontrolle	30% rF	143,12	30,67	1365,93	214,52	89,50	5,19
<i>Betula</i>	III SO <sub>2</sub>	30% rF	131,69	32,70	1453,29	443,41	88,19	8,73
<i>Betula</i>	IV Kontrolle	50% rF	133,10	35,32	2199,39	1027,42	81,25	5,59
<i>Betula</i>	IV SO <sub>2</sub>	50% rF	130,24	36,50	1813,34	744,47	91,36	8,07
<i>Betula</i>	V Kontrolle	70% rF	123,00	32,48	1481,09	279,30	87,75	10,04
<i>Betula</i>	V SO <sub>2</sub>	70% rF	137,88	74,96	1444,05	100,33	84,20	3,06
<i>Betula</i>	VIII Kontrolle	50% rF	148,36	74,11	1386,90	717,65	96,60	5,24
<i>Betula</i>	VIII Partikel	50% rF	159,13	97,69	1015,35	72,81	77,85	15,48
<i>Phleum</i>	VII Kontrolle	50% rF	247,87	197,15	370,95	67,06	133,30	14,96
<i>Phleum</i>	VII Partikel	50% rF	283,56	192,92	355,67	52,85	149,11	17,40
<i>Phleum</i>	IX Kontrolle	50% rF	446,78	4,35	523,34	192,73	151,31	11,67
<i>Phleum</i>	IX VOC	50% rF	388,86	50,44	463,30	217,48	162,28	8,31

Tabelle 4.2.4: Vergleich von 10 mg Pollen der *in vitro* Expositionen: Schadstoff versus Kontrolle im t-Test mit einem Signifikanz-Niveau von  $p = 0,05$  ( $n=3$ ).

Art	Expositionsbedingungen			Extrakt	lg PALM-LTB <sub>4</sub> t-Test p	lg PALM-PGE <sub>2</sub> t-Test p	lg Protein t-Test p	lg Bet v 1 t-Test p
	t-Test	rF %	Dauer h					
<b>Betula</b>	5ppm Schwefeldioxid versus Kontrolle	30	16	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,938	0,060	0,046	0,112
	5ppm Schwefeldioxid versus Kontrolle	30	16	RPMI	0,904	0,655	0,144	
	5ppm Schwefeldioxid versus Kontrolle	50	16	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,224	0,074	0,265	0,942
	5ppm Schwefeldioxid versus Kontrolle	50	16	RPMI	0,605	0,489	0,812	
	5ppm Schwefeldioxid versus Kontrolle	70	16	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,770	0,627	0,640	0,006
	5ppm Schwefeldioxid versus Kontrolle	70	16	RPMI	0,856	0,898	0,628	
	200 µg Partikel versus Kontrolle	50	4	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,734	0,040	0,205	0,019
	200 µg Partikel versus Kontrolle	50	4	RPMI	0,959	0,527	0,187	
<b>Pleum</b>	200 µg Partikel versus Kontrolle	50	6	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,596	0,560	0,584	
	200 µg Partikel versus Kontrolle	50	6	RPMI	0,789	0,787	0,433	
	1 MAK VOC versus Kontrolle	50	6	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,994	0,198	0,047	
	1 MAK VOC versus Kontrolle	50	6	RPMI	0,229	0,689	0,249	

Zur Veranschaulichung sind in den folgenden Graphen der Gehalt an Polleninhaltsstoffen getrennt nach Pollenart und Extraktmethode aufgezeigt. Es zeigte sich, dass die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit wesentlich stärker zwischen *Betula*- und *Phleum*-Pollen ausgeprägt waren als durch die Schadstoffe Modifikationen erreicht wurden.

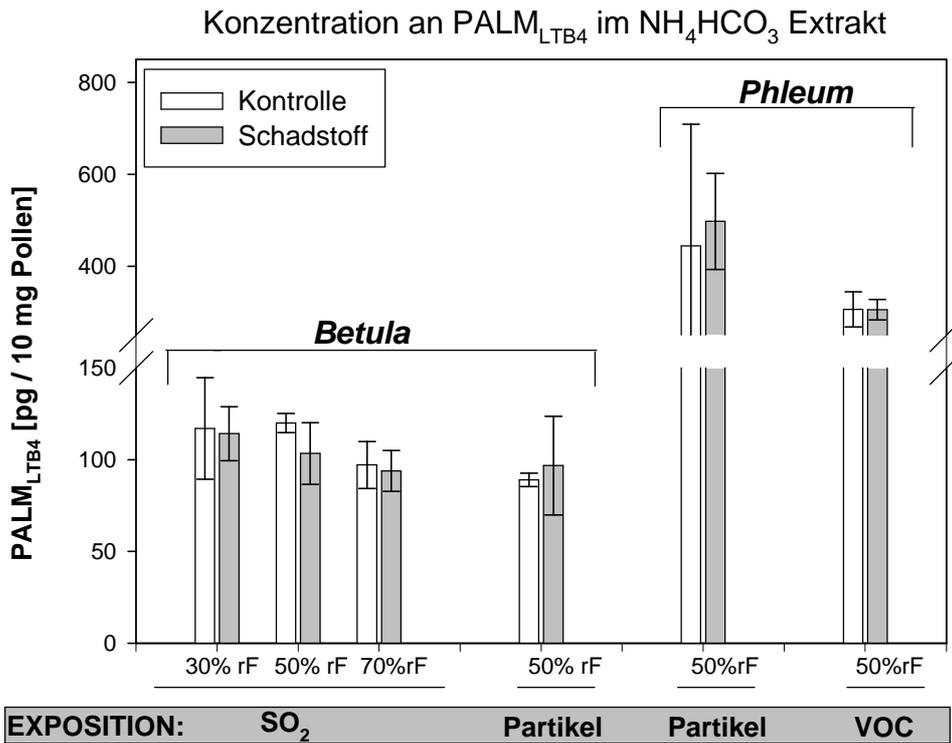


Abbildung 4.2.6: Gehalt an PALM<sub>LTB4</sub> im NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> Extrakt (n=3) für die verschieden im Wirbelschichtreaktor exponierten *Betula*- und *Phleum*-Pollen.

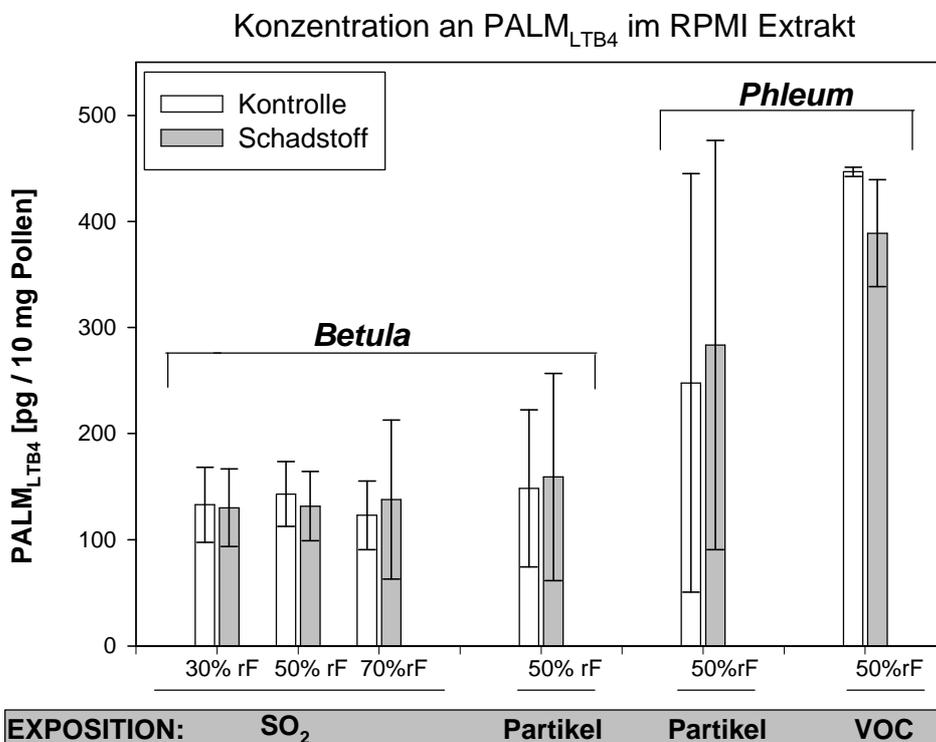


Abbildung 4.2.7: Gehalt an PALM<sub>LTB4</sub> im RPMI Extrakt (n=3) für die verschieden im Wirbelschichtreaktor exponierten *Betula*- und *Phleum*-Pollen.

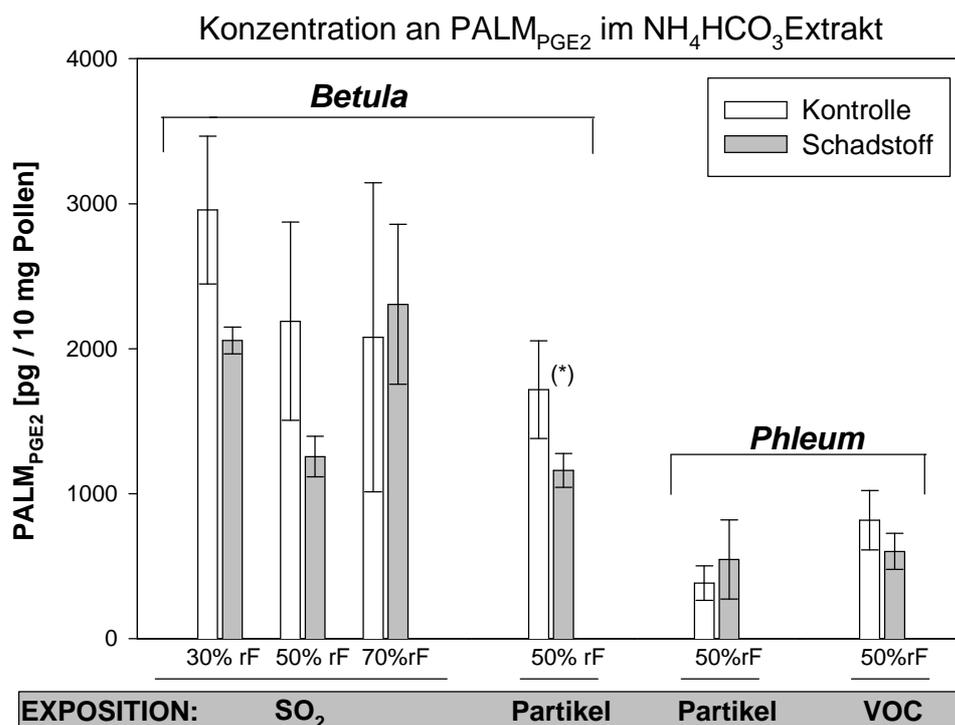


Abbildung 4.2.8: Gehalt an PALM<sub>PGE2</sub> im NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> Extrakt (n=3) für die verschieden im Wirbelschichtreaktor exponierten *Betula*- und *Phleum*-Pollen. (\*) Statistische Auswertung mit transformierten, normalverteilten Werten; signifikante Werte p = 0,05 im t-Test.

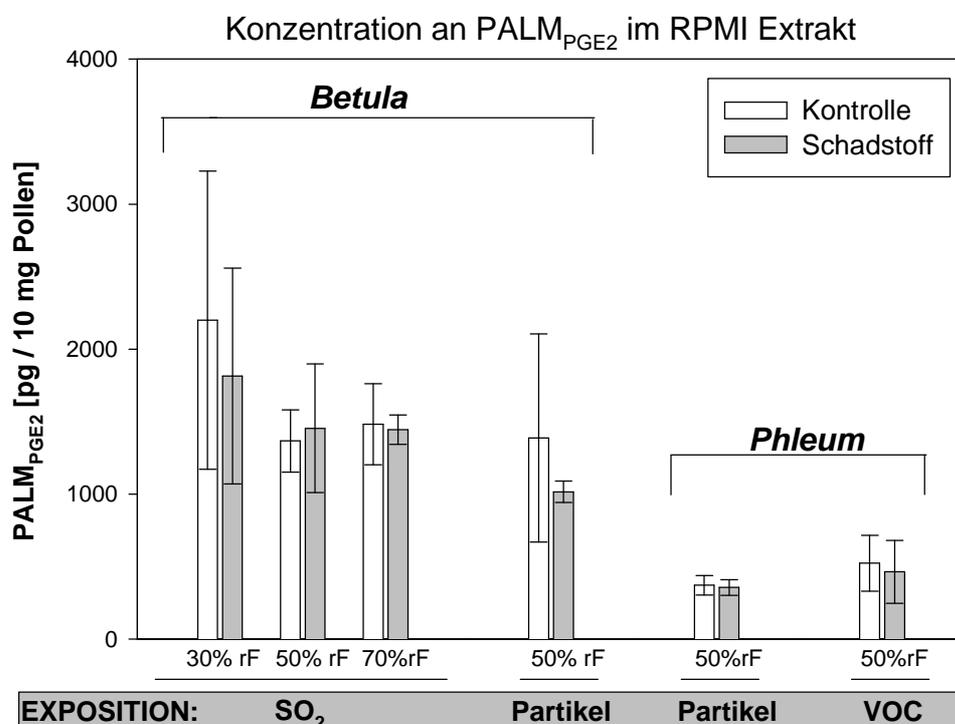


Abbildung 4.2.9: Gehalt an PALM<sub>PGE2</sub> im RPMI Extrakt (n=3) für die verschieden im Wirbelschichtreaktor exponierten *Betula*- und *Phleum*-Pollen.

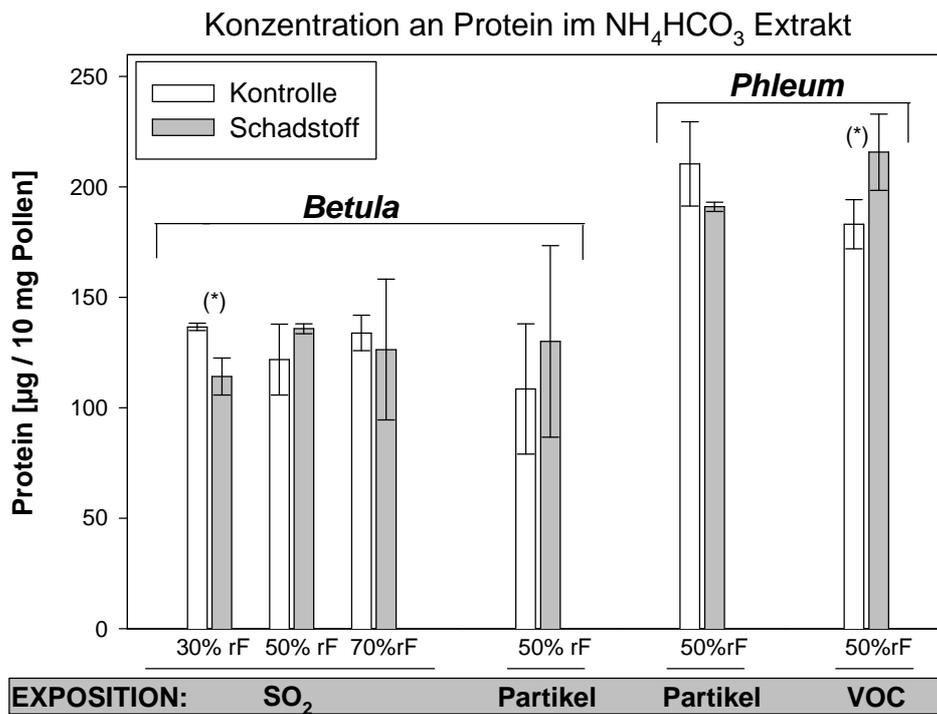


Abbildung 4.2.10 Gehalt an Protein im Ammoniumbicarbonat Extrakt (n=3) für die verschieden im Wirbelschichtreaktor exponierten *Betula*- und *Phleum*-Pollen. (\*) Statistische Auswertung mit transformierten, normalverteilten Werten; signifikante Werte p = 0,05 im t-Test.

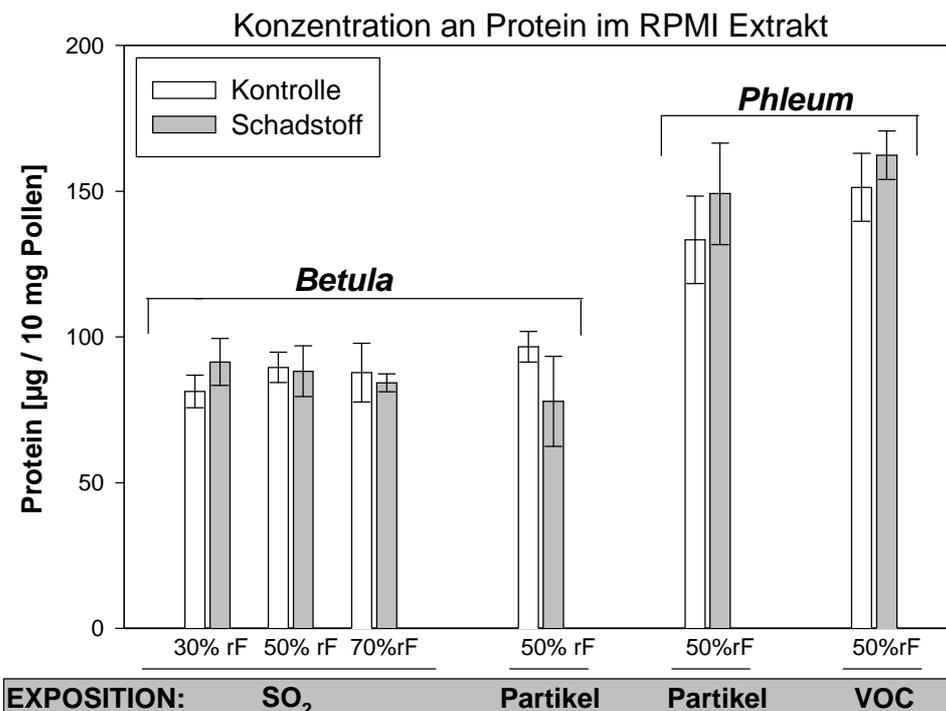


Abbildung 4.2.11: Gehalt an Protein im RPMI Extrakt (n=3) für die verschieden im Wirbelschichtreaktor exponierten *Betula*- und *Phleum*-Pollen.

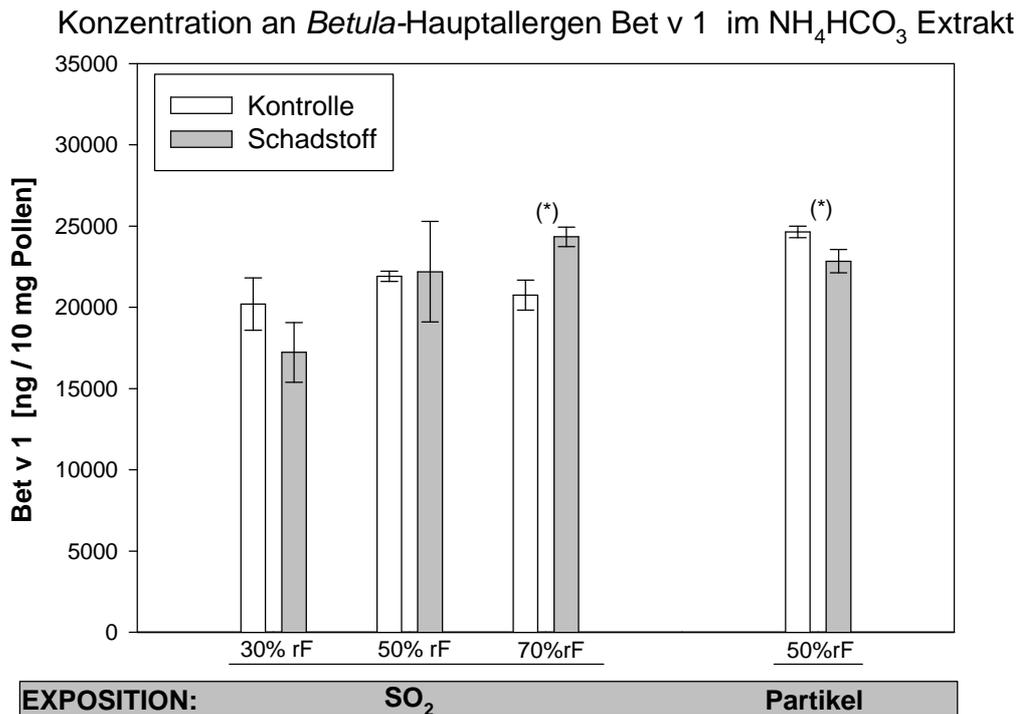


Abbildung 4.2.12: Gehalt an Bet v 1 im Ammoniumbicarbonat Extrakt (n=3) für die verschieden im Wirbelschichtreaktor exponierten *Betula*-Pollen. (\*) Statistische Auswertung mit transformierten, normalverteilten Werten; signifikante Werte  $p = 0,05$  im t-Test.

#### 4.2.4 Artunterschiede bei der Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe

Die Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe unterschied sich zwischen den Arten *Betula* und *Phleum*. Für die Analyse wurden alle Expositionen der *Betula*- bzw. der *Phleum*-Pollen zusammengefasst, um eine statistisch aussagekräftige Probenanzahl zu erhalten. Es fielen erhebliche Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe zwischen *Betula*-Pollen (n = 8) und *Phleum*-Pollen (n = 4), die von der Firma Allergon bezogen wurden, auf. In Abbildung 4.2.13, Abbildung 4.2.14 und Abbildung 4.2.15 werden die Unterschiede graphisch in Boxplot-Diagrammen veranschaulicht. Die detaillierten Daten sind in Tabelle 4.2.2 und Tabelle 4.2.3 nachzuschlagen. Mittels t-Test wurden die Artunterschiede der Polleninhaltsstoffe bezogen auf 10 mg Pollen auf ihr Signifikanz-Niveau von  $p=0,05$  hin getestet. Die Bioverfügbarkeit der  $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$  war bei *Phleum*-Pollen gegenüber den *Betula*-Pollen (Extrakt:  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$   $p=0,001$ ; RPMI  $p=0,006$ ) signifikant erhöht (siehe Abbildung 4.2.13). Der Gehalt an  $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$  ist stattdessen signifikant höher bei *Betula*-Pollen im Vergleich zu

*Phleum*-Pollen (Extrakt  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$   $p=0,0$ ; RPMI  $p=0,0$ ), die wenig an  $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$  freisetzen (siehe Abbildung 4.2.14). Aus Abbildung 4.2.15 geht hervor, dass die *Phleum*-Pollen mehr Protein freisetzen als die *Betula*-Pollen (Extrakt  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$   $p=0,0$ ; RPMI  $p=0,0$ ). Am deutlichsten unterschied sich der Gehalt an  $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ , der um Faktor 3,35 im Ammoniumbicarbonat-Extrakt und um Faktor 3,52 im RPMI-Extrakt bei *Phleum*-Pollen erhöht war.

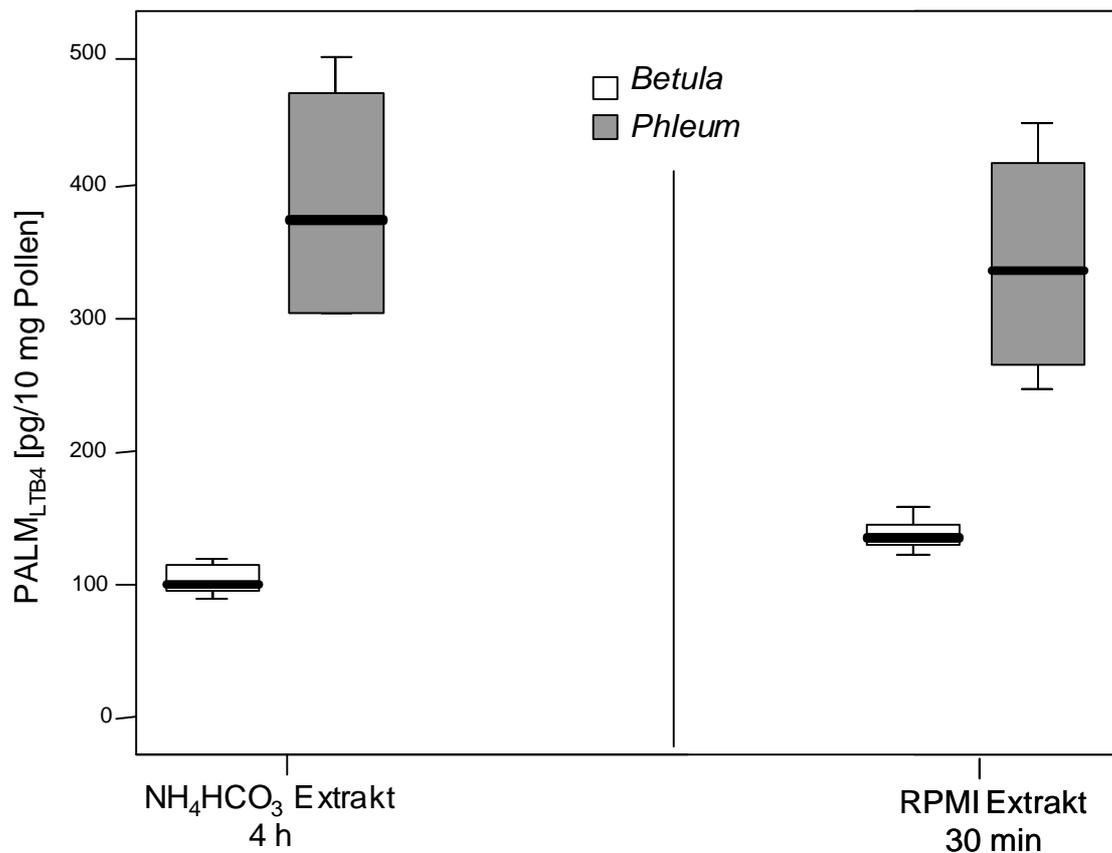


Abbildung 4.2.13: Bioverfügbarkeit der PALM-leukotrien-ähnlichen Substanzen ( $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ ) in 10 mg Pollen in Abhängigkeit von Extrakt und Pollenart - Boxplotdiagramme: Dicker Strich Median, untere Grenze der Box 25% Perzentil, obere Grenze der Box 75% Perzentil. Die ober- und unterhalb der Box stehenden Querstriche geben den größten und kleinsten Wert an.

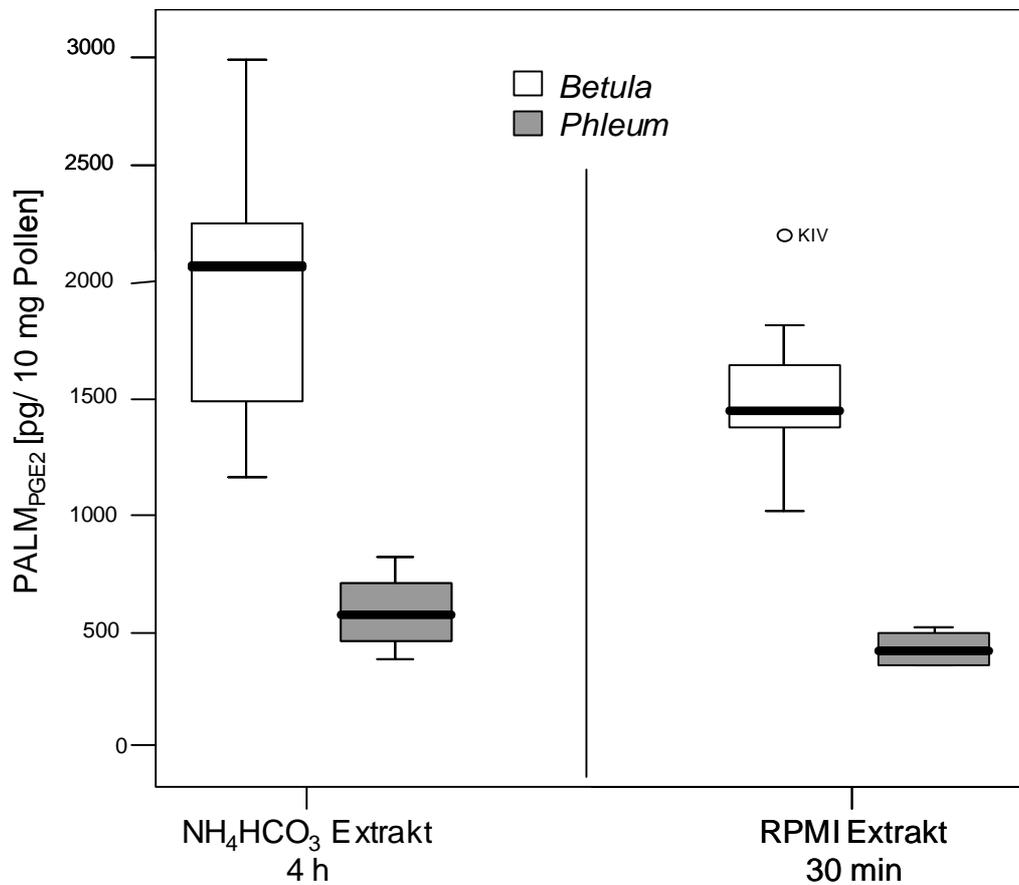


Abbildung 4.2.14: Bioverfügbarkeit der PALM-prostaglandin-ähnlichen Substanzen (PALM<sub>PGE2</sub>) in 10 mg Pollen in Abhängigkeit von Extrakt und Pollenart - Boxplotdiagramme: Dicker Strich Median, untere Grenze der Box 25% Perzentil, obere Grenze der Box 75% Perzentil. Die ober- und unterhalb der Box stehenden Querstriche geben den größten und kleinsten Wert an. ° Werte: Werte, die mehr als das 1,5fache der Länge der Box entfernt liegen.

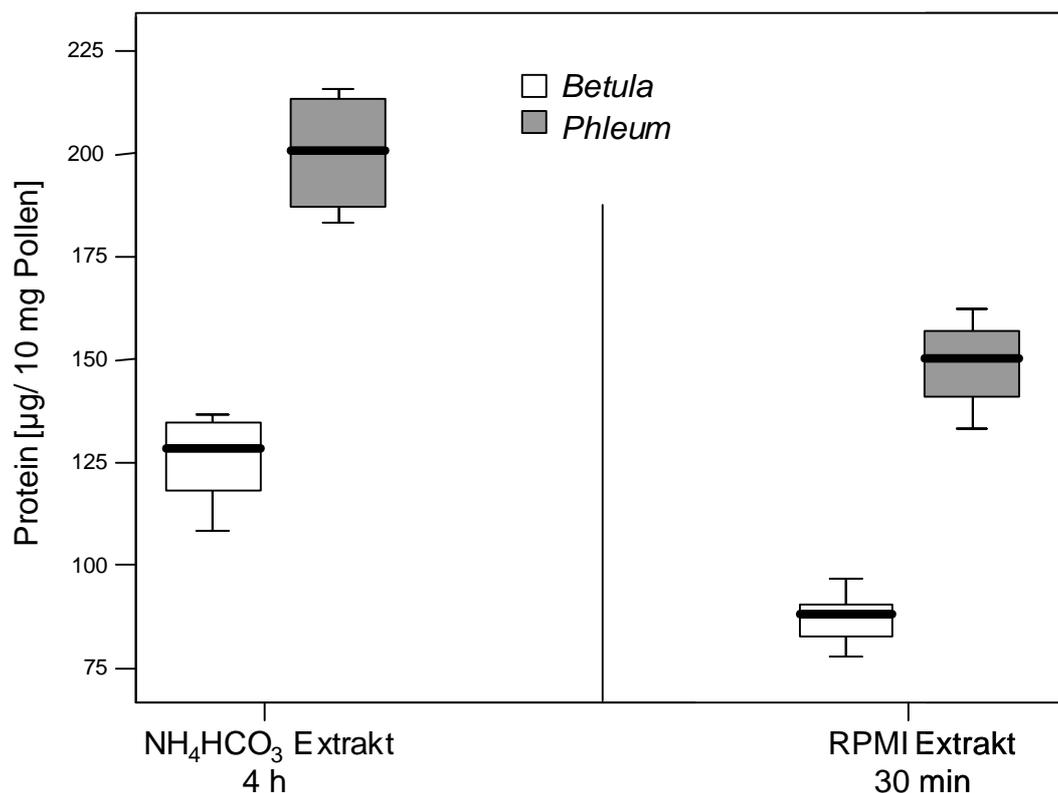


Abbildung 4.2.15: Bioverfügbarkeit der Proteine in 10 mg Pollen in Abhängigkeit von Extrakt und Pollenart - Boxplotdiagramme: Dicker Strich Median, untere Grenze der Box 25% Perzentil, obere Grenze der Box 75% Perzentil. Die ober- und unterhalb der Box stehenden Querstriche geben den größten und kleinsten Wert an.

#### 4.2.5 Nachweis von biologischer Aktivität im Pollenextrakt von *in vitro* exponierten Pollen

##### 4.2.5.1 Einfluss der Pollenextrakte von *in vitro* exponierten Pollen auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay

In Wirbelschichtreaktoren wurden *Betula*- und *Phleum*-Pollen unter Zustrom von Schadstoffen (SO<sub>2</sub>, Partikel, VOC) exponiert. Der Einfluss der Pollen-Extrakte auf die Aktivierung von humanen neutrophilen Granulozyten wurde in Migrationsassays untersucht. Je größer der Migrationsindex desto stärker die chemotaktische Wirkung der Pollenextrakte auf humane neutrophile Granulozyten

(siehe Tabelle 4.2.5). Alle Migrationsindizes wurden auf die LTB<sub>4</sub>-Kontrolle bezogen, um Spendervariationen auszugleichen.

Die humanen neutrophilen Granulozyten wurden am stärksten durch den 10 mg Pollenextrakt aktiviert, der von den unter 30% relativen Luftfeuchte exponierten *Betula*-Pollen stammte. Es wurde ein Migrationsindex von 0,77 erreicht, der nur um 0,23 Zählerpunkte geringer war als der Migrationsindex der LTB<sub>4</sub>-Kontrolle. Die geringste chemotaktische Wirkung wurde durch den 10 mg Pollenextrakt aus der Kontrollexposition (bei 50% rF für sechs Stunden exponierten *Betula*-Pollen) erzielt. Die meisten Pollenextrakte übten eine chemotaktische Wirkung von einer Stärke von 0,4 (standardisierter Migrationsindex) aus.

Tabelle 4.2.5: Einfluss der Pollenextrakte *in vitro* exponierter Pollen auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay. Standardisierte Migrationsindizes (MI) der Pollenextrakte, Extrakte hergestellt aus den *in vitro* exponierten Pollen in Abhängigkeit der eingesetzten Pollenkonzentration.

Art	Expositionsbedingungen			Pollen-Konzentration [mg]	Mittelwert MI	SD MI	Anzahl n
	Exposition	% rF	Dauer [h]				
<i>Betula</i>	Kontrolle	30	16	1	0,77	0,32	3
				3	0,53	0,18	3
				10	0,45	0,31	3
	Schwefeldioxid	30	16	1	0,43	0,09	3
				3	0,40	0,12	3
				10	0,67	0,17	3
	Kontrolle	50	16	1	0,44	0,24	3
				3	0,43	0,08	3
				10	0,33	0,04	3
	Schwefeldioxid	50	16	1	0,45	0,22	3
				3	0,46	0,19	3
				10	0,36	0,05	3
	Kontrolle	70	16	1	0,38	0,23	3
				3	0,46	0,15	3
				10	0,50	0,07	3
	Schwefeldioxid	70	16	1	0,30	0,07	3
				3	0,57	0,23	3
				10	0,49	0,16	3
Kontrolle	50	4	1	0,47	0,28	2	
			3	0,36	0,04	2	
			10	0,23	0,20	2	
Partikel	50	4	1	0,30	0,02	2	
			3	0,29	0,18	2	
			10	0,34	0,05	2	
<i>Phleum</i>	Kontrolle	50	6	1	0,48	0,04	2
				3	0,51	0,06	2
				10	0,52	0,21	2
	Partikel	50	6	1	0,29	0,02	2
				3	0,36	0,01	2
				10	0,62	0,20	2
	Kontrolle	50	6	1	0,27	0,13	2
				3	0,27	0,05	2
				10	0,31	0,04	2
	VOC	50	6	1	0,22	0,06	2
				3	0,26	0,04	2
				10	0,37	0,05	2

#### 4.2.5.1.1 Einfluss der Schadstoff-exponierten Pollen auf den Migrationsindex im Vergleich zu den mit synthetischer Luft exponierten Pollen

Es wurden Pollenextrakte, hergestellt aus Pollen der jeweiligen Kontrollexposition (mit synthetischer Luft) mit den Pollen, die unter Zustrom von Schadstoffen (SO<sub>2</sub>, Partikel, VOC) exponiert wurden, anhand ihres chemotaktischen Potentials auf humane neutrophile Granulozyten verglichen. Es zeigte sich bei den *in vitro* Expositionen kein signifikanter Unterschied (t-Test) zwischen den mit Schadstoff belasteten Pollen und ihren Kontrollen (siehe Tabelle 4.2.6). Unter Betrachtung der Pollenmenge ergab sich außer bei einer Pollenkonzentration von 1 mg der mit Partikel exponierten *Phleum*-Pollen (p=0,047, n=2) keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4.2.6: Einfluss der *in vitro* Exposition auf die chemotaktische Wirkung der Pollenextrakte auf neutrophile Granulozyten im Migrationsassay: Mittelwert (MW) der standardisierten Migrationsindizes (MI), Standardabweichung (SD) der Migrationsindizes (MI), t-Test mit Signifikanz-Niveau p = 0,05.

Art	Expositionsbedingungen	MW MI	SD MI	n	t-Test p	
<b>Betula</b>	Schwefeldioxid, 30% rF	0,58	0,28	9	0,464	
	Kontrolle	0,50	0,17	9		
	Schwefeldioxid, 50% rF	0,40	0,14	9	0,747	
	Kontrolle	0,42	0,15	9		
	Schwefeldioxid, 70% rF	0,45	0,15	9	0,911	
	Kontrolle	0,45	0,19	9		
<b>Phleum</b>	Partikel, 50% rF	0,35	0,19	9	0,605	
	Kontrolle	0,31	0,09	9		
	<b>Phleum</b>	Partikel, 50% rF	0,50	0,10	6	0,366
		Kontrolle	0,42	0,18	6	
		VOC, 50% rF	0,28	0,07	6	0,985
		Kontrolle	0,28	0,08	6	

#### 4.2.5.1.2 Korrelation der gemessenen Pollen-assoziierten Lipidmediatoren im Pollenextrakt mit den standardisierten Migrationsindizes

Leukotriene und Prostaglandine sind typische Chemoattraktanzien von neutrophilen Granulozyten. In Pollenextrakten wurden chemisch ähnliche

strukturelle Substanzen mittels HPLC nachgewiesen. Mittels eines ELISA von Amersham Bioscience, der generell zur Messung des Leukotrien B<sub>4</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub> in Säugetierzellen eingesetzt wird, wurden die kreuzreagierenden PALMs in den Pollenextrakten quantitativ bestimmt. Es zeigte sich, dass zwischen dem Gehalt an gemessenen PALMs und den Migrationsindizes kein signifikanter Zusammenhang bestand (siehe Tabelle 4.2.7).

Tabelle 4.2.7: Korrelation der Migrationsindices mit den Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub> und PALMs).

Kreuzdiagramm		Ig PALM <sub>LTB4</sub>	Ig PALM <sub>PGE2</sub>	Ig PALMs
<b>Migrationsindex</b>	Korrelation nach Pearson	- 0,392	+ 0,083	+ 0,064
	Signifikanz (2-seitig)	0,208	0,798	0,844
	N	12	12	12

#### 4.2.5.1.3 Vergleich der standardisierten Migrationsindices zwischen *Betula*- und *Phleum*-Pollenextrakten

Es wurde getestet, ob die beiden Pollenarten *Betula* und *Phleum* eine unterschiedlich starke chemotaktische Wirkung auf humane neutrophile Granulozyten ausüben konnten. In der Tabelle 4.2.8 sind die Mittelwerte der Migrationsindices, die Standardabweichung und der minimale und maximale Wert verzeichnet.

Tabelle 4.2.8: Artvergleich der Migrationsindizes; Mittelwert, Standardabweichung, minimaler (Min) und maximaler (Max) Migrationsindex in Abhängigkeit von der Pollenkonzentration.

Art	Anzahl n	Pollenkonzentration mg / ml RPMI-Extrakt	Migrationsindex			
			Mittelwert	Standardabweichung	Min	Max
<b><i>Betula</i></b>	9	1	0,44	0,15	0,3	0,77
	9	3	0,44	0,09	0,29	0,57
	9	10	0,42	0,13	0,23	0,67
<b><i>Phleum</i></b>	4	1	0,32	0,11	0,22	0,48
	4	3	0,35	0,12	0,26	0,51
	4	10	0,45	0,14	0,31	0,62

In der Abbildung 4.2.6 ist der Vergleich der erreichten Migrationsindizes aus Pollenextrakten von *Betula*- und *Phleum*-Pollen graphisch dargestellt. Es wurde deutlich, dass bei *Phleum* die berechneten Mediane bei Erhöhung der Pollenkonzentration kontinuierlich anstiegen. Bei *Betula* hingegen war die maximale Aktivierung der neutrophilen Granulozyten schon bei 3 mg Pollen zu beobachten. Bei 10 mg *Betula*-Pollen im Extrakt kam es zu keiner weiteren Aktivierung der neutrophilen Granulozyten. Der Migrationsindex sank bereits wieder ab. Die Migrationsmittelwerte des *Betula*-Pollenextraktes sind bei einer Pollenkonzentration von 1 und 3 mg höher als die des *Phleum*-Pollenextraktes (siehe Tabelle 4.2.8). Besonders auffällig war die starke Migration des Pollenextraktes aus der Exposition IV\_K (30% rF, Kontrolle), bei der *Betula*-Pollen unter einer relativen Luftfeuchte von 30% exponiert wurden. Die unterschiedlich starke Aktivierung der neutrophilen Granulozyten war jedoch nicht signifikant ( $p=0,184$ ) artspezifisch. Dies galt auch für eine getrennt nach den einzelnen Pollenkonzentrationen durchgeführte Auswertung.

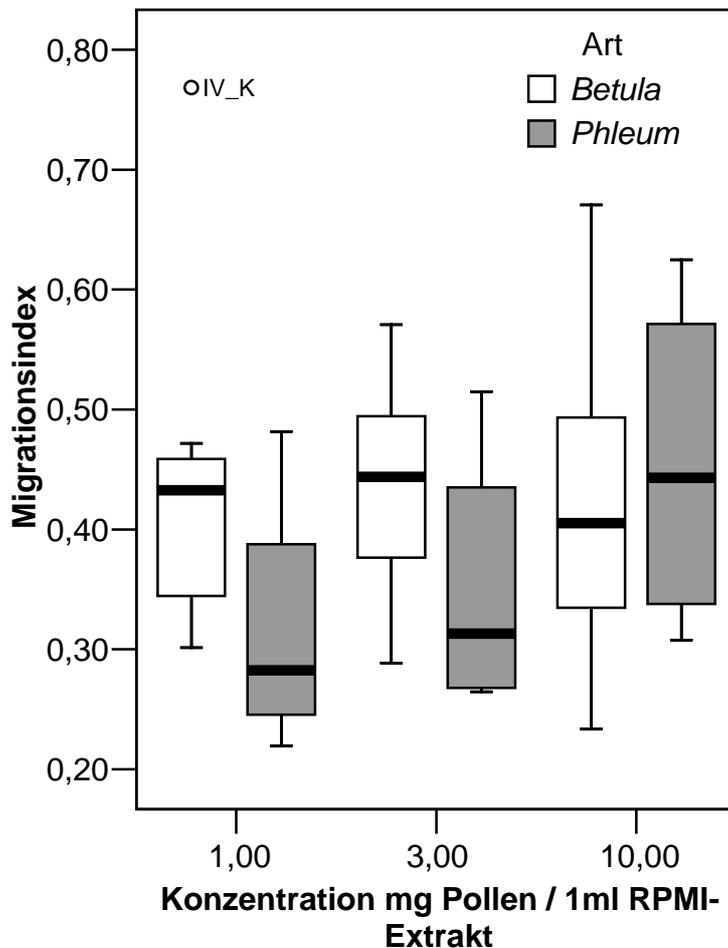


Abbildung 4.2.16: Vergleich der Wechselwirkung von *Betula*- und *Phleum*-Pollenextrakten als Chemoattraktanz mit neutrophilen Granulozyten im Migrationsassay in Abhängigkeit der Pollenkonzentrationen. Boxplot: Dicker Strich Median des standardisierten Migrationsindizes, untere Grenze der Box 25% Perzentil, obere Grenze der Box 75% Perzentil. Die ober- und unterhalb der Box stehenden Querstriche geben den größten und kleinsten Wert an. Extrem Werte: ° Werte: Werte, die mehr als das 1,5fache der Länge der Box entfernt liegen.

#### 4.2.5.2 Antioxidatives Potential von Pollenextrakten

Die Bestimmung des antioxidativen Potentials in PBS-Pollenextrakten erfolgte mit dem Diphenylpicrylhydrazyl-(DPPH)-Test in Zusammenarbeit mit Dr. Bors (Institut für Strahlenbiologie, GSF, Neuherberg).

#### 4.2.5.2.1 Vergleich des antioxidativen Potentials der *in vitro* exponierten Pollen

Die Pollenextrakte der mit Schwefeldioxid unter verschiedenen Luftfeuchten (30%, 50%, 70%) exponierten Birkenpollen zeigten keine Unterschiede in ihrem antioxidativen Potential, da die Steigungen innerhalb eines Graphens nahezu identisch waren (siehe Abbildung 4.2.17). Dies zeigt, dass unabhängig von der Expositionsart, aber in Abhängigkeit vom eingesetzten Extraktvolumen, gleich viele Radikale abgefangen werden konnten.

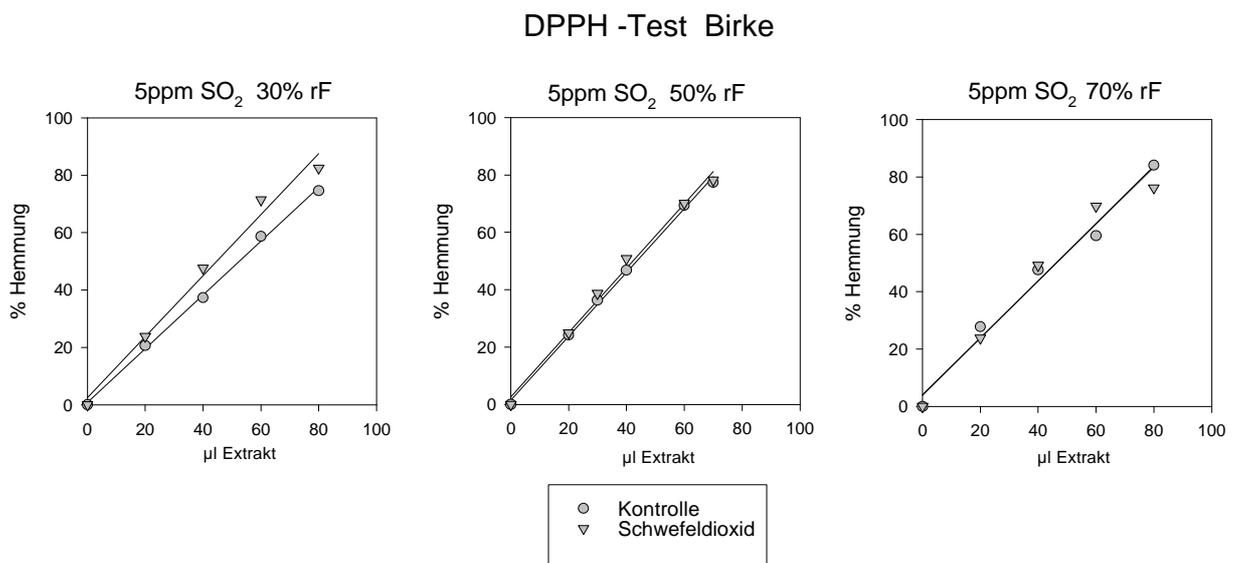


Abbildung 4.2.17: Antioxidative Wirkung von Birkenpollen-Extrakten - Vergleich der unterschiedlich exponierten Birkenpollen gemessen als Hemmung im DPPH-Test in Prozent.

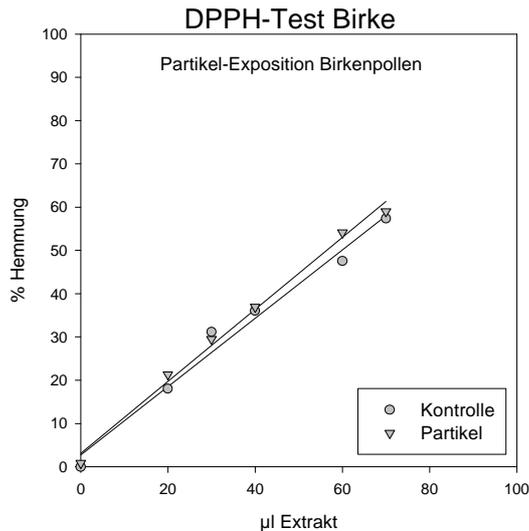


Abbildung 4.2.18: Antioxidative Wirkung von Birkenpollen-Extrakten – Hemmung im DPPH-Test durch Birkenpollen-Extrakte von Partikel-exponierten Birkenpollen in Prozent.

Auch beim Vergleich der mit Partikeln exponierten *Betula*- und *Phleum*- Pollen-Extrakte konnten keine Unterschiede im antioxidativen Potential zwischen den mit Partikeln exponierten Pollen zu deren Kontrolle aufgezeigt werden, wohl aber artspezifische Unterschiede. Abbildung 4.2.18 zeigt das *Betula*-Experiment. Bei *Phleum*-Pollenextrakten war die Steigung der Geraden fast Null, da fast keine antioxidative Wirkung des Extraktes festzustellen war.

#### 4.2.5.2.2 Artspezifische Unterschiede im antioxidativen Potential von Pollenextrakten

Um festzustellen, welches antioxidative Potential weitere Pollenarten aufwiesen, wurden mehrere Arten mit dem DPPH-Test analysiert. Klinisch relevante Pollen wie Hasel (*Corylus avellana*), Erle (*Alnus incana*), Birke (*Betula verrucosa*), Beifuß (*Artemisia vulgaris*) und Gras (*Phleum pratense*) wurden analysiert. Als Pollen, die in Deutschland keine relevanten Allergien auslösen, wurden Kiefernpollen (*Pinus sylvestris*) eingesetzt. In Abbildung 4.2.19 ist der Vergleich des Radikalfänger-Potentiales der verschiedenen Pollen-Arten zueinander dargestellt.

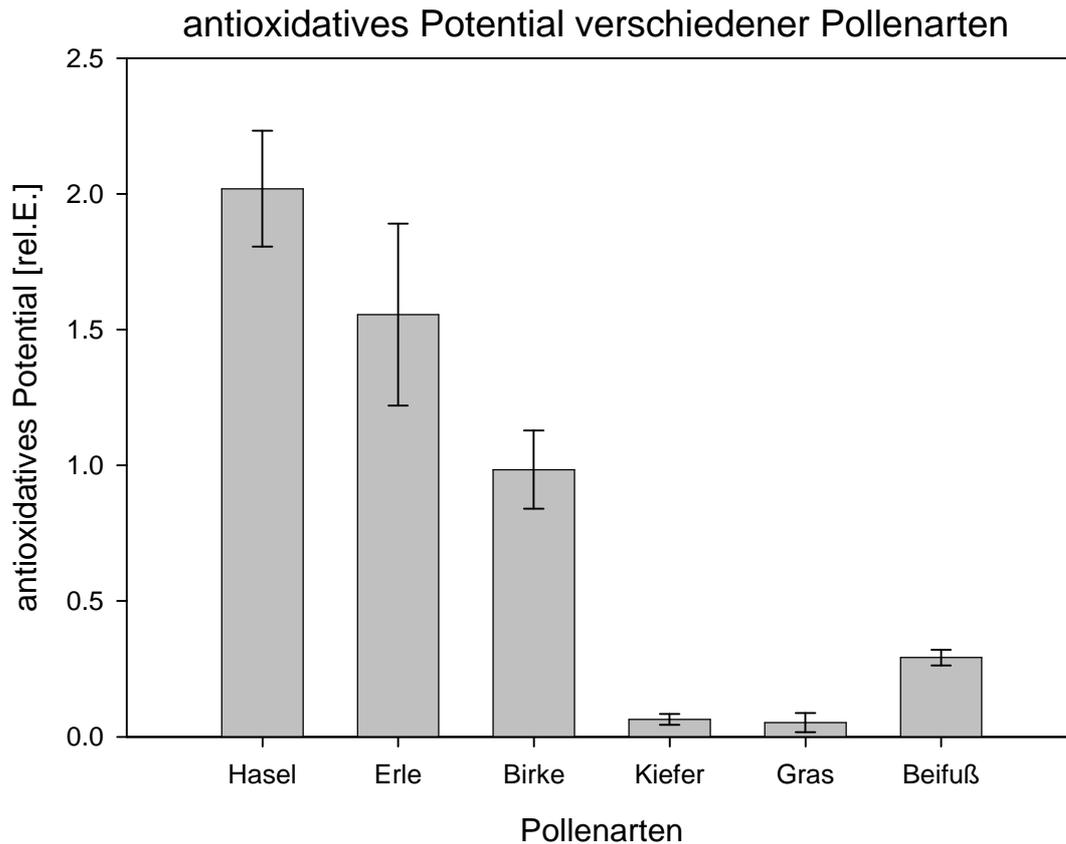


Abbildung 4.2.19: Vergleich des antioxidativen Potentials der Pollenextrakte verschiedener Arten, geordnet nach dem saisonalen Pollenflug (n = 4).

Das höchste antioxidative Potential wurde in den Haselpollen-Extrakten nachgewiesen. Erlenpollen-Extrakte zeigten auch sehr gute Radikalfänger Eigenschaften. Birkenpollen-Extrakte wiesen ein mittleres Potential auf. Beifußpollen zeigten im Test ein geringeres Potential Radikale abzufangen. Kiefer- und Graspollen besaßen fast kein antioxidatives Potential. Ein Zusammenhang des Potentials mit der Allergenität der Pollen ist nicht zu erkennen, wohl aber der artspezifische Einfluss.

### 4.3 Nachweis von Lipoxygenase in Pollen

Das Enzym Lipoxygenase leitet bei Säugetierzellen den Stoffwechselweg ein, bei dem Leukotrien gebildet wird. Diese Substanzen werden vermehrt bei Entzündungsreaktionen gebildet. Bei Pollen sind Substanzen, die Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs), die strukturell den Leukotrienen aber auch den Prostaglandinen sehr ähnlich sind, beschrieben worden (Traidl-Hoffmann et

al. 2002, Plötz et al. 2004, Traidl-Hoffmann et al. 2005). Auch in Pollen sollte das Enzym Lipoxygenase mittels Westernblot nachgewiesen werden.

#### **4.3.1 Optimierung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot**

Da bei Pflanzen das Enzym Lipoxygenase ca. 100 kDa groß ist, eignet sich für die Auftrennung des Proteinextraktes ein 7,5%iges Polyacrylamid Gel. Zur Optimierung wurde die Pollenmenge bestimmt, um eine hohe Ausbeute an gelösten Proteinen in 1 ml Extraktionslösung zu erhalten. Es zeigte sich, dass 20 mg gemörserte Pollen am besten geeignet waren, da hier genügend Protein freigesetzt wurde und der Flüssigkeitsverlust durch unlösliches Zellmaterial nicht zu groß war. Die maximale Lademenge von 80 µl für eine 4 cm breite und 7 mm hohe Tasche wurde eingesetzt. Der aufgetrennte Proteinextrakt wurde auf ein Nitrozellulose Papier geblottet. Um zu überprüfen, ob der Proteintransfer optimal funktioniert hat, wurde das Polyacrylamidgel nach dem Blotten mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

#### **4.3.2 Optimierung des Antikörpernachweises**

Zum Nachweis der Lipoxygenase in Pollen stand ein polyklonaler Lipoxygenase Antikörper für Gurke (HV) und Gerste (LB) zur Verfügung. Am Anfang der Studie war nicht klar, ob diese Antikörper auch an eventuell vorhandene Pollenlipoxygenasen, gut binden würden. Mehrere Inkubationszeiten und Antikörperkonzentrationen wurden getestet (siehe Abbildung 4.3.1). Bei der Bande mit einer Größe von ca. 96 kDa hat der Lipoxygenaseantikörper beim *Phleum*-Extrakt gebunden. Auch bei der als Kontrolle verwendete Proteinextrakt von frischen Gurkenkeimlingen ist hier eine Bande zu sehen. Auffällig ist, dass bei *Phleum* wesentlich mehr Pollenextrakt für den eindeutigen Nachweis nötig war, als bei der Gurke. Für *Betula* war nur mit dem Antikörper LB (Gerste) die Bande bei 66 kDa sichtbar, ein vermutliches Spaltprodukt der Lipoxygenase (siehe Abbildung 4.3.2). Der Antikörper der Gurke war für *Betula* zu unspezifisch, da keine Bande im Blot erkennbar wurde.

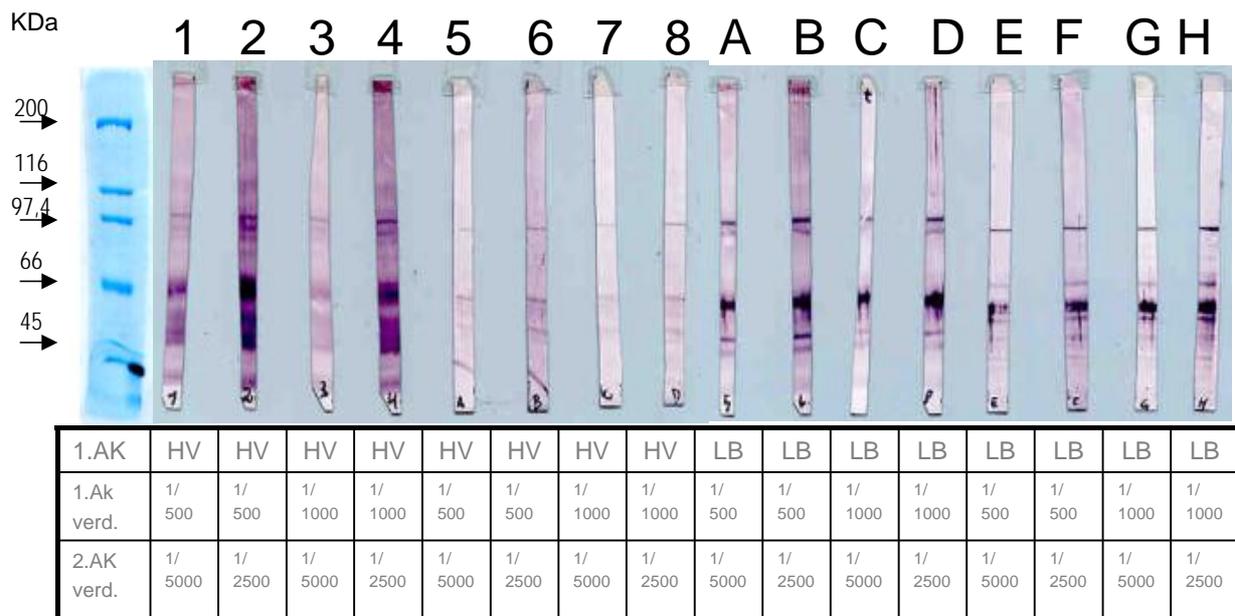


Abbildung 4.3.1: Blot von *Phleum*-Pollen Extrakt im Vergleich zu Gurken-Extrakt. Lipoxygenase-Bande bei den Antikörpern HV und LB unter verschiedenen Konzentrationsbedingungen (1.Antikörper (AK) 1/500 oder 1/1000); 2.Antikörper (AK) 1/5000 oder 1/2500).

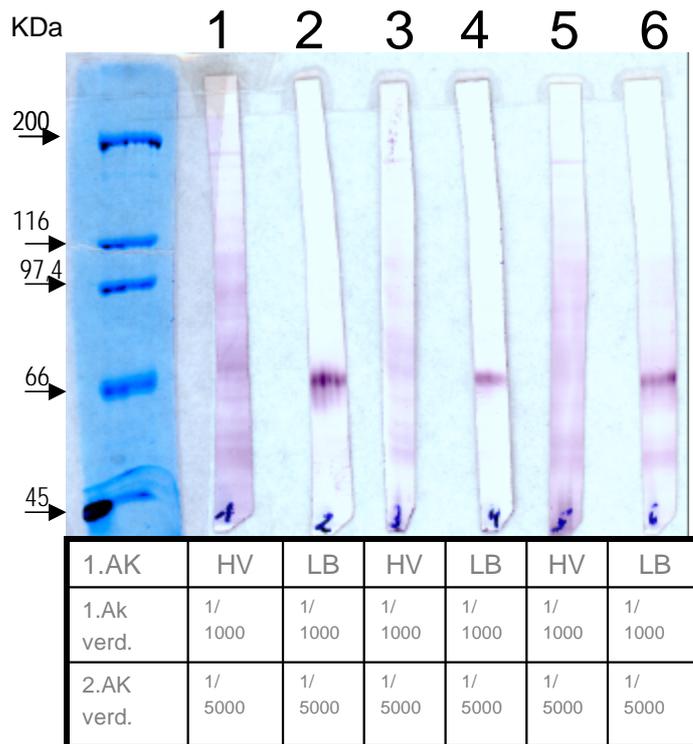


Abbildung 4.3.2: Blot von *Betula*-Pollen Extrakt. Vermutliches Spaltprodukt der Lipooxygenase bei 66 kDa mit Antikörper (AK) LB.

#### 4.4 Identifizierung von Stressgenen in Birkenpollen mittels cDNA Mikroarray-Technologie

Diese Mikroarray-Versuche wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Durner und Dr. von Rad (Institut für biochemische Pflanzen-Pathologie, GSF, Neuherberg) durchgeführt. Um die Genexpressionsunterschiede zwischen einer Landbirke und einer Stadtbirke zu analysieren, wurde RNA der Pollen von den Standorten Nr. 104 (Land) mit der Nr. IV (Stadt) verglichen. Diese Bäume wurden ausgewählt, da sich ihre Verkehrsbelastung deutlich unterschied: Score eins für den Standort 100 (niedrige Belastung) Score zehn (hohe Belastung) für den Standort IV. Der eingesetzte cDNA-Chip war ursprünglich für die Expressions-Analyse von Stressgenen in *Arabidopsis thaliana* etabliert worden. Da aufgrund der fehlenden Sequenzdaten des Birken-Genoms kein spezifischer Birken-Chip etabliert werden konnte, wurde dieser Chip stattdessen verwendet.

#### 4.4.1 RNA-Isolierung aus Birkenpollen

Die RNA-Isolierung aus Birkenpollen wurde dahingehend optimiert, ausreichende Mengen an RNA für den Mikroarray zu erhalten, gleichzeitig aber möglichst sparsam mit der begrenzten Pollenmenge umzugehen. So konnte die anfänglich eingesetzte Pollen-Menge zur RNA-Isolierung von 400 mg Pollen auf 100 mg reduziert werden. Die optimalen Isolierungsbedingungen sind im Methodenteil 4.4.1 genauer beschrieben. Standardmäßig konnte mindestens 60 µg RNA aus 100 mg Pollen isoliert werden. Die RNA-Konzentrationsbestimmungen erfolgten im Eppendorf-Biophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Qualität der RNA wurde in einem 1 %igen Agarosegel überprüft (siehe Abbildung 4.4.1). Die Gesamt-RNA besitzt als Hauptmenge klar definierte einheitliche Größenklassen. Im Gel sind die Banden der 28 S rRNA und 18 S rRNA eindeutig erkennbar, somit ist es zu keiner Degradation während der Probenverarbeitung gekommen. Zusätzlich wurde im Eppendorf-Photometer der Quotient der Absorptionen 260 nm/280 nm bestimmt, der die Reinheit der Probe angibt. Der Quotient lag bei allen Proben um die Zwei, was auf reine RNA hindeutet.

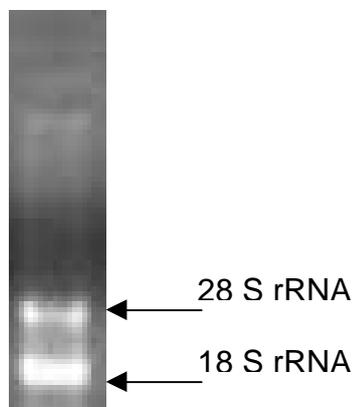


Abbildung 4.4.1: Beispiel-RNA aus Birkenpollen in 1% Agarose-Gel.

#### 4.4.2 Reverse Transkription (RT-PCR) zur Herstellung von Birken cDNA

Da anfänglich die Hybridisierung der Birken cDNA an den Mikroarray-Chip Schwierigkeiten bereitete, wurde die Qualität der RNA noch zusätzlich mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) überprüft. Dies sollte die Entscheidung erleichtern, ob die Sequenzhomologien von Birkenpollen-DNA zu *Arabidopsis*

*thaliana*- DNA für eine Hybridisierung an den Mikroarray-Chip ausreichen, oder ob die eingesetzte RNA nicht die nötige Qualität aufwies. Dazu wurde die reverse Transkription zur Herstellung von Birkenpollen- cDNA optimiert und eine PCR mit den Primern für das Allergen Bet v 1 und dem Referenzgen 18 S rRNA etabliert. Die reverse Transkription wurde mit dem „First strand synthese“ Kit von Roche durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass nur eine vorherige Erhitzung bei 65°C der RNA für 15 min und anschließende sofortige Abkühlung für 5 min auf Eis eine vollständige Transkription der RNA in cDNA ermöglichte. Dies wurde festgestellt, da nur mit dieser Methode die PCR erfolgreich durchgeführt werden konnte.

#### 4.4.3 Qualitätskontrolle der cDNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein µg *Betula*-Pollen-RNA wurde eingesetzt um in einem Volumen von 20 µl cDNA zu generieren. Die PCR-Bedingungen mit der *Betula*-cDNA wurden für die Primer des Allergens Bet v 1 und des Referenzgens 18 S rRNA optimiert. Bet v 1 zeigt eine spezifische Bande bei 480 bp an und 18 S rRNA bei 136 bp.

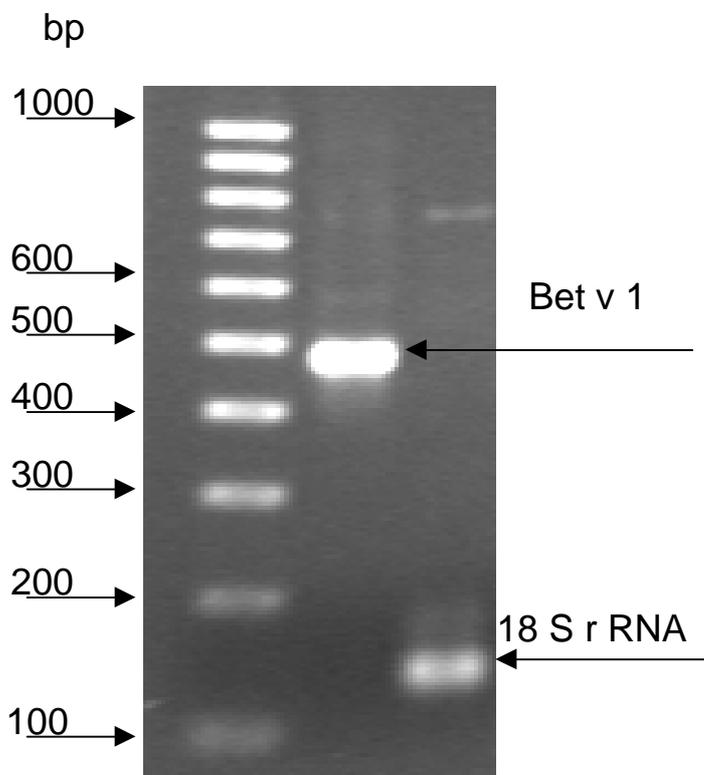


Abbildung 4.4.2: Bet v 1 und 18 S rRNA DNA-Banden in 1% Agarose-Gel-.

#### 4.4.4 Mikroarray mit Pollen-RNA

Der verwendete *Arabidopsis* Array trägt über 700 Stressgene. Der Array ist aufgeteilt in ca. 50% spezifische Sonden (Sequenzen aus dem nicht kodierenden Bereich der *Arabidopsis* Sequenzen) und 50% Sequenzen aus dem kodierenden Bereich (expressed sequence tags/ESTs). Wenn es zu einer Hybridisierung der cDNA der Birkenpollen mit den Sonden auf dem Array kam, war ein deutliches Signal bei diesem Spot messbar. In Tabelle 4.4.1 sind die Ergebnisse der Spots, die hybridisiert haben, aufgelistet. 76 Gene waren in den Birkenpollen exprimiert. Alle anderen Spots waren aufgrund von zu schwachen oder fehlenden Signalen nicht auswertbar. Bei mehreren ESTs kam es zu keiner Hybridisierung im Array. Zum einen könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass die Birken-Sequenzen sich stark von den *Arabidopsis*-Sequenzen unterscheiden, oder dass im Pollen relativ wenige bzw. andere Gene exprimiert waren. Es zeigten 76 Gene von über 700 Genen eine Hybridisierung. Von den getesteten 700 Sonden waren die Hälfte spezifische Sonden für *Arabidopsis thaliana*. Hier kam es wie erwartet zu keiner Hybridisierung mit der Birken-cDNA. Aber 20% der ESTs haben mit Birken cDNA hybridisiert. Bei einem Expressionsunterschied von 2 oder höher wäre das Gen in den „Stadtpollen“ höher exprimiert als in den „Landpollen“, bei einem Wert von 0,5 oder weniger wäre es in den „Stadtpollen“ herunterreguliert worden. Wie aus der Tabelle 4.4.1 zu entnehmen, zeigte keines dieser Gene eine signifikante Induktion bzw. Reduktion der Genexpression. Die Werte bewegten sich zwischen 0,77 und 1,7. Der cDNA Array ermöglichte es, 76 Birkenpollengene, die mit Pflanzenstress assoziiert sind, mittels dieses Screening Verfahren zu identifizieren.

Tabelle 4.4.1: Identifizierte Birkengene: Internationale Kennung der Gene (ID), Name der Gene, Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Varianzkoeffizient (CV), Anzahl (n), minimaler (Min) und maximaler (Max) Wert.

ID	Name	MW	Median	SD	CV	n	Min	Max
At1g09560	germin-like protein	1,681	1,681	0,379	22,543	2	0,907	3,115
At3g57240	glycosyl hydrolase family 17 (beta-1,3-glucanase bg3)	1,644	1,644	0,583	35,484	2	0,636	4,248
AC 006932 nt 88	neoxanthin cleavage protein	1,62	1,62	0,663	40,956	2	0,55	4,77
TC118651	guanine nucleotide regulatory protein - fava bean	1,565	1,565	0,362	23,112	2	0,868	2,819
At3g23810	S-adenosyl-L-homocysteinase, putative	1,513	1,513	0,637	42,125	2	0,536	4,269
At5g47550	putative protein	1,491	1,491	0,289	19,371	2	0,932	2,387
R30099	eukaryotic initiation factor 4A-2 (EIF-4F-2)	1,408	1,408	0,073	5,158	2	1,251	1,584
N38121	inward rectifier potassium channel Kir 1.4	1,406	1,406	0,592	42,127	2	0,536	3,687
T20487		1,401	1,401	0,766	54,694	2	0,402	4,877
At2g40940	ethylene response sensor (ERS)	1,392	1,392	0,413	29,641	2	0,711	2,725
At1g10470		1,38	1,38	0,307	22,224	2	0,837	2,273
At5g62920	response regulator 6 (ARR6)	1,371	1,371	0,343	25,04	2	0,784	2,398
At2g23210	UDP-glycosyltransferase family	1,349	1,349	<invalid>	<invalid>	1	1,349	1,349
T88637	glycolate oxidase-like protein	1,328	1,328	0,336	25,317	2	0,768	2,295
TC103646	GF14 epsilon isoform; 14-3-3 protein GF14 epsilon;	1,292	1,292	0,084	6,503	2	1,127	1,481
T75716	ripening-induced protein and major latex protein	1,289	1,289	0,443	34,371	2	0,627	2,653
H37587	heat shock transcription factor -like protein	1,276	1,276	0,568	44,474	2	0,506	3,215
At3g44320	nitrilase 3	1,244	1,244	0,32	25,713	2	0,739	2,094
TC113425	cyclic nucleotide and calmodulin-regulated ion channel	1,242	1,242	0,185	14,881	2	0,919	1,678
TC105445	putative Cys3His zinc-finger protein	1,233	1,233	0,082	6,623	2	1,08	1,408
At4g08500	MEK1/MAP kinase kinase	1,226	1,226	0,103	8,371	2	1,038	1,449
At4g31500	cytochrome p450 family	1,221	1,221	<invalid>	<invalid>	1	1,221	1,221
At1g21270	wall-associated kinase 2	1,21	1,21	0,228	18,819	2	0,835	1,754
At2g34430	photosystem II type I chlorophyll a /b binding protein	1,21	1,21	0,284	23,49	2	0,762	1,922
T20553	DNA-binding protein GT-2- A. thaliana	1,203	1,203	0,194	16,121	2	0,877	1,649
TC115647	chalcone isomerase; chalcone flavanone isomerase	1,184	1,184	0,292	24,644	2	0,736	1,904
At3g28940	AIG2-like protein	1,179	1,179	0,189	16,001	2	0,867	1,604
T88627	N-acetylmuramyl-(pentapeptide)-pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase;	1,159	1,159	0,272	23,508	2	0,744	1,805
T21765	MtN19	1,151	1,151	0,429	37,308	2	0,572	2,315
H76953	ornithine carbamoyltransferase	1,15	1,15	0,472	41,044	2	0,533	2,481
At3g48100	response reactor 2 (ARR2)	1,149	1,149	0,143	12,426	2	0,911	1,45
R65310	pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit	1,148	1,148	0,233	20,281	2	0,786	1,678
R30215	Triose phosphate isomerase chloro. precursor	1,135	1,135	0,084	7,416	2	0,989	1,301
At4g37360	cytochrome p450 family	1,1	1,1	<invalid>	<invalid>	1	1,1	1,1
At1g07890	ascorbate peroxidase, putative (APX)	1,089	1,089	0,206	18,947	2	0,778	1,523
At3g01420	feebly-like protein	1,078	1,078	0,227	21,06	2	0,745	1,56
T44910	serine/threonine kinase-like protein	1,064	1,064	0,393	36,937	2	0,561	2,016
TC117679	arginine-tRNA-protein transferase 1; Ate1p	1,062	1,062	0,494	46,554	2	0,475	2,375
TC110518	zinc finger protein 4;	1,048	1,048	0,513	48,947	2	0,455	2,415
R30627	fructose biphosphate aldolase; cytoplasmic isozyme	1,045	1,045	0,516	49,388	2	0,451	2,421
At5g13110	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1,043	1,043	0,562	53,921	2	0,417	2,604
NP222441	Arabidopsis thaliana mRNA for arginine/serine-rich splicing factor; RSp40	1,041	1,041	0,385	36,958	2	0,556	1,947
TC115436	polyubiquitin; polyubiquitin (ubq3)	1,041	1,041	0,064	6,18	2	0,937	1,155
TC103532	seed imbibition protein	1,027	1,027	0,277	26,994	2	0,654	1,614
T04343	small nuclear ribonucleoprotein U1A	1,026	1,026	0,234	22,757	2	0,702	1,501
TC115635	mitochondrial uncoupling protein	1,017	1,017	0,2	19,663	2	0,734	1,408
TC116104	complement component C8 beta chain precursor	1,013	1,013	0,352	34,791	2	0,571	1,797
H37620	proline-rich unknown protein	1,001	1,001	0,432	43,088	2	0,496	2,022
R90486	transcription factor; ccr4-associated factor homolog (putative)	1	1	0,416	41,631	2	0,508	1,97
At3g22370	alternative oxidase 1a precursor	0,99	0,99	0,439	44,33	2	0,484	2,022
N38204	elongation factor 1-beta A1 (EF-beta)	0,989	0,989	0,285	28,809	2	0,622	1,573
H37113	chloroplast triose phosphate translocator precursor (CTPT)	0,986	0,986	0,127	12,919	2	0,802	1,214
H76532	ribosomal protein L13a	0,98	0,98	0,387	39,498	2	0,522	1,841
TC103568	arginine decarboxylase SPE2	0,969	0,969	0,092	9,501	2	0,834	1,126
H36546	MADS box transcription factors (similar to)	0,959	0,959	0,058	6,026	2	0,873	1,053
At3g55120	chalcone-flavanone isomerase (chalcone isomerase) (CHI)	0,944	0,944	0,386	40,853	2	0,504	1,769
AT3g28344	ABC-69	0,943	0,943	0,283	29,97	2	0,595	1,494
H37082	phosphoglycerate kinase precursor	0,941	0,941	0,332	35,263	2	0,548	1,615
At4g21980	symbiosis-related like protein	0,937	0,937	0,48	51,237	2	0,429	2,046
T44718	sulfate transporter	0,915	0,915	0,21	22,998	2	0,65	1,289
At3g20130_EST	Cytochrome P450	0,913	0,913	0,266	29,105	2	0,592	1,407
H36107	serine/threonine kinase	0,906	0,906	0,197	21,754	2	0,657	1,248
T44735	receptor protein kinase-like protein	0,899	0,899	0,295	32,762	2	0,557	1,453
R90371	20S proteasome beta subunit PBB2	0,897	0,897	0,127	14,147	2	0,729	1,102
H37475	DAG-like protein; chloroplast precursor	0,892	0,892	0,302	33,894	2	0,545	1,459
At3g54640	tryptophan synthase alpha chain	0,89	0,89	0,511	57,454	2	0,387	2,047
N65389	AP2 domain containing protein RAP2.5	0,877	0,877	0,264	30,141	2	0,57	1,35
At2g31570	glutathione peroxidase, putative	0,862	0,862	0,363	42,046	2	0,478	1,556
At3g55430	glycosyl hydrolase family 17 (beta-1,3-glucanase)	0,839	0,839	0,268	31,904	2	0,543	1,297
At1g77760	nitrate reductase 1 (NR1)	0,835	0,835	0,139	16,689	2	0,666	1,048
H76215	xyloglucan endotransglycolase-related protein XTR-7	0,821	0,821	0,43	52,323	2	0,408	1,654

## **4.5 Komparative Proteomstudie von Land- und Stadt-Birkenpollen mittels 2D Elektrophorese**

### **4.5.1 Optimierung der Probenaufbereitung und der 2D elektrophoretischen Trennungsbedingungen für Birkenpollen-Extrakte**

Ziel war es, die elektrophoretischen Bedingungen derart zu wählen, dass eine optimale, reproduzierbare Auftrennung der Proteinspots in den Acrylamidgelen erreicht wurde. Des Weiteren mussten die Pollen gut aufgeschlossen werden, um mit einem geeigneten Extraktionspuffer möglichst viel Protein in Lösung zu bringen. Dafür wurden verschiedene Proteinextrakte getestet. Da die frisch gesammelten Birkenpollen aus München in ihrer Menge limitiert waren, erfolgte die Methoden-Optimierung mit käuflichen Birkenpollen von der Firma Allergon. Die Visualisierung der Proteine, erfolgte durch Anfärbung der Proteine mit einer Silberfärbung. Beispielgele sind in Abbildung 4.5.1 und Abbildung 4.5.2 zu sehen, bei denen für die Proteintrennung zwei verschiedene pH-Gradienten verwendet wurden. Für die optimale Birkenprotein-Auftrennung mittels 2 D Elektrophorese eignete sich ein 14%igen Polyacrylamidgel am besten. Im niedermolekularen Bereich befanden sich Proteine, die mit hohen Quantitäten auffielen. Dabei handelt es sich vermutlich um das Birkenallergen Bet v 1, das ein Molekulargewicht von 17 kDa hat, generell hochexprimiert ist und in mehreren Isoformen vorkommt.

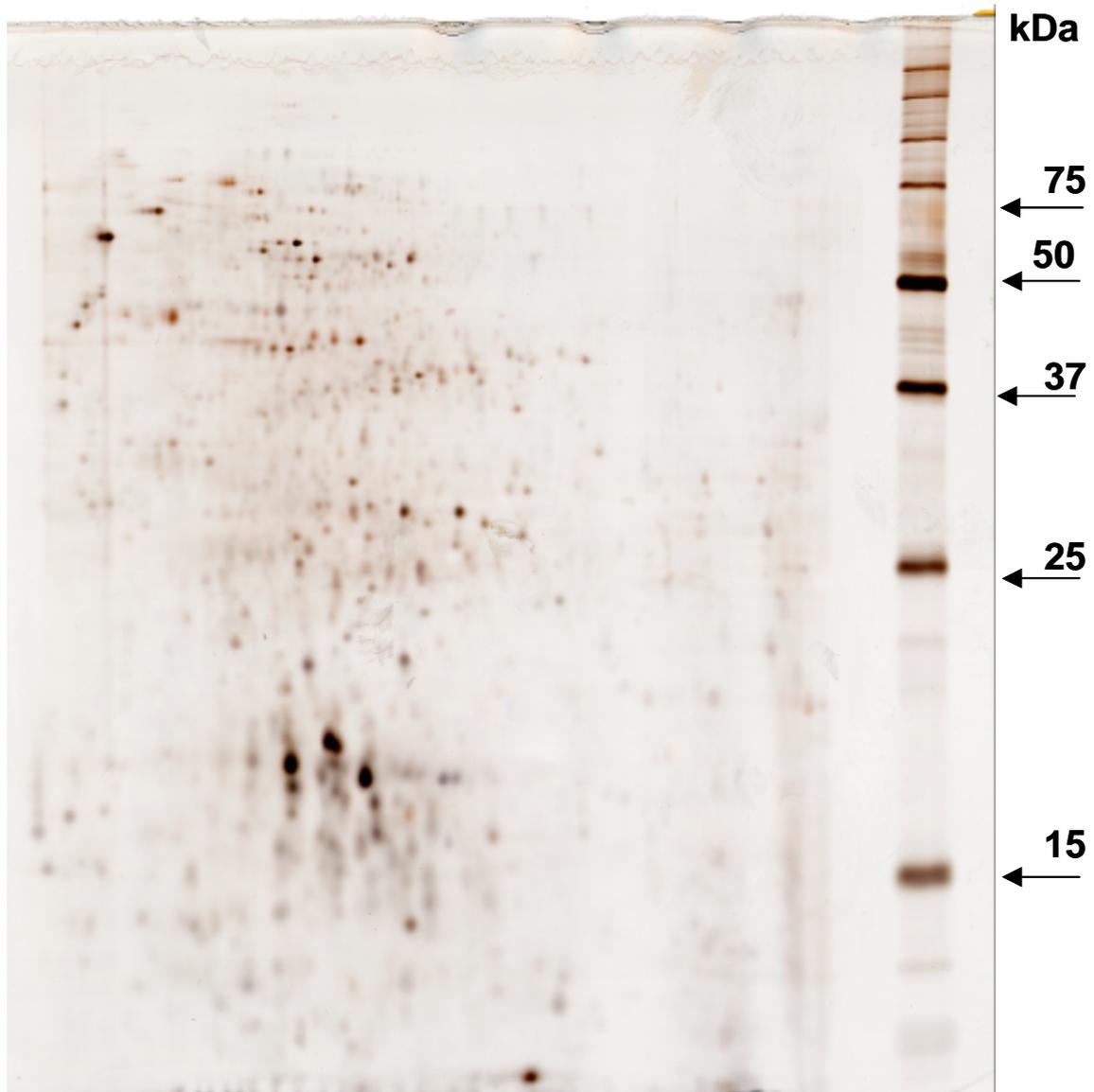


Abbildung 4.5.1: Silbergefärbte 14%ige Polyacrylamidgele von Birkenpollen-Extrakt; pH Gradienten 3-10.

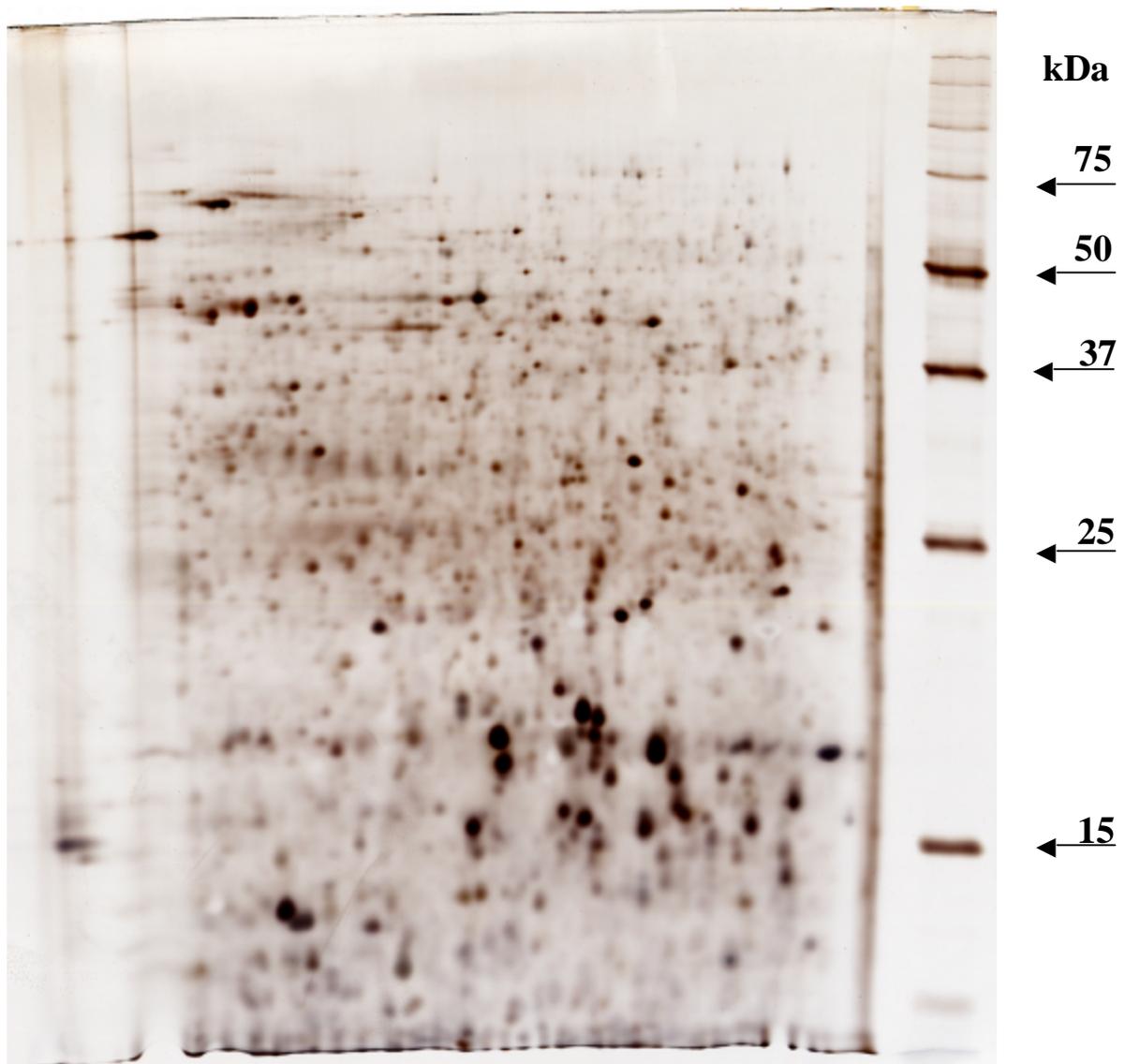


Abbildung 4.5.2: Silbergefärbte 14%ige Polyacrylamidgele von Birkenpollen-Extrakt; pH Gradient 4-7.

Beim Vergleich der Auftrennung der Proteine mit unterschiedlichen pH-Gradienten fiel beim Gel mit einer Proteintrennung im pH-Bereich von 3-10 auf, dass die Birkenpollen wenig Proteinspots im pH-Bereich von 7-10 aufwiesen. Es war deutlich zu erkennen, dass der pH Gradient von 4-7 eine deutlichere Auftrennung der Proteine erkennbar machte. Der Lysepuffer 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff wurde bei der Untersuchung für die Quantifizierung von Proteinen mittels Fluoreszenz bevorzugt. Hier wurde zusätzlich eine bessere Löslichkeit der Proteine, besonders im höher molekularen Bereich, erreicht, als im Lysis-Extrakt aus 9 M Harnstoff. Aus diesen Gründen erfolgte für die komparativen Studien eine Proteinauftrennung im T14%igen Acrylamidgel und einer isoelektrischen Fokussierung im Bereich von pH 4-7 unter Verwendung des Puffers mit 7M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff.

#### **4.5.2 Quantitative Analyse der Proteinexpression mittels Difference Gelelektrophorese**

Um möglichst sensitiv geringe Expressionsunterschiede zwischen den Proteomen von Land- und Stadtbirkenpollen aufzulösen, wurde die so genannte Difference Gelelektrophorese (DIGE) angewendet. Hierbei wurden die Proteine mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern vor der elektrophoretischen Auftrennung markiert. Der Vorteil dieser Methode war es, dass aufgrund der verschiedenen Fluoreszenzmarker (Cy3-Marker für „Landpollen-“, Cy5-Marker für „Stadtpollen-Extrakt“ und Cy2-Marker für den internen Standard) die Proben in ein und dem selben Gel gleichzeitig getrennt werden konnten. Aufgrund des mitgeführten internen Standards konnten die intra- und interbedingten Schwankungen der elektrophoretischen Methode für alle Gele abgeglichen werden. Zusätzlich ist der lineare Messbereich um Faktor  $10^3$  besser als bei silbergefärbten Gelen, was eine höhere Bandbreite an Expressionsunterschieden bedeutete. Die Proben wurden nicht gepoolt und jede Pollenprobe von einem Baum wurde einzeln markiert. Abbildung 4.5.3 zeigt exemplarisch die Trennung der Birkenpollen-Extrakte aus München. Das Gel wurde mit den unterschiedlich anregbaren Fluoreszenz-Markern gescannt und einzeln dargestellt.

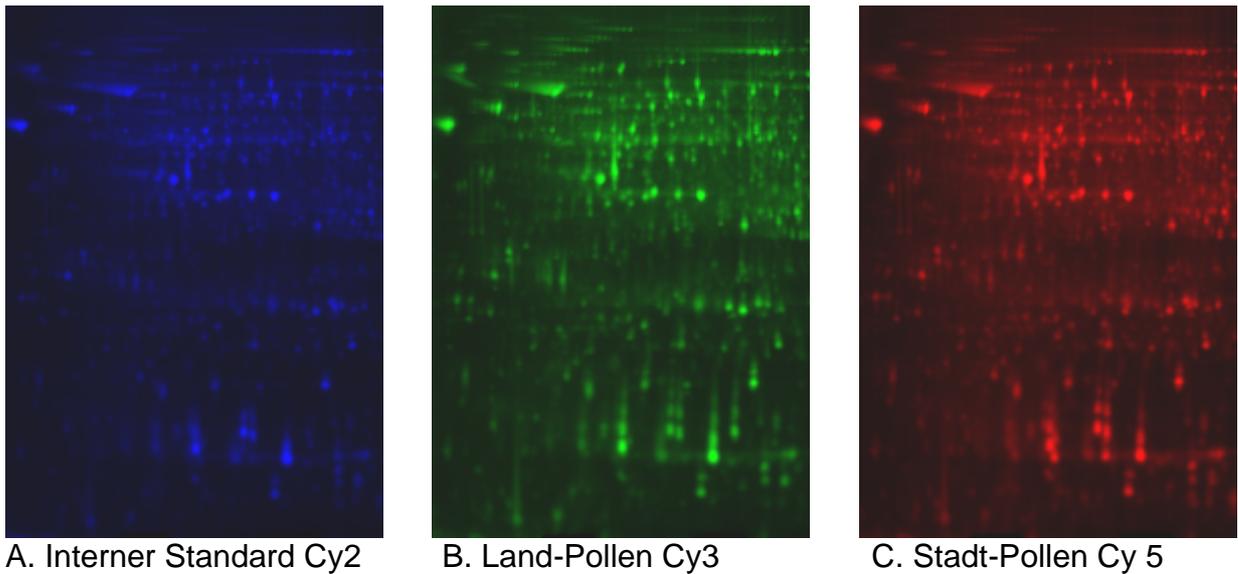


Abbildung 4.5.3: 2D Gel angeregt bei verschiedenen Wellenlängen. A. Interner Standard angeregt mit Cy2, B. Landbirkenproteom markiert mit Fluorophor Cy3, C. Stadtbirkenproteom markiert mit Cy5.

Exemplarisch ist in Abbildung 4.5.3 B das Landpollenproteom, der Birkenpollen gesammelt vom Standort Nr. 100 (Landkreis Freising), sichtbar. Zum Vergleich wurde das Stadtpollenproteom vom Standort Nr. 5 (Heckenstallerstrasse, München) dargestellt (siehe Abbildung 4.5.3 C). In blau dargestellt ist der Interne Standard, der die gepoolte Probe zu gleichen Teilen aus allen beteiligten Proben beinhaltet (siehe Abbildung 4.5.3 A). Die Proteinspots sind deutlich voneinander abgegrenzt, so dass die comparative Proteom-Analyse erfolgen konnte.

#### 4.5.3 Computerunterstützte-statistische Auswertung der Expressions-Level der Proteine

Es wurden vier „Landpollen-“ (Standorte Nr. 100,101,102,104) und vier „Stadtpollen“-Proteinextrakte (Standorte Nr. 5, 22, IV, V1) verglichen. Für diese comparative Proteomstudie wurde die DeCyder Software von Amersham Bioscience verwendet. Typische Proteinspots konnten in der rotierenden 3D Ansicht kontrolliert werden. In Abbildung 4.5.4 ist exemplarisch ein Proteinspot aufgeschlüsselt dargestellt. Die abgerundete Kegelform mit Kreisdurchmesser stellt ein besonders gutes Beispiel für ein elektrophoretisch aufgetrenntes Protein dar.

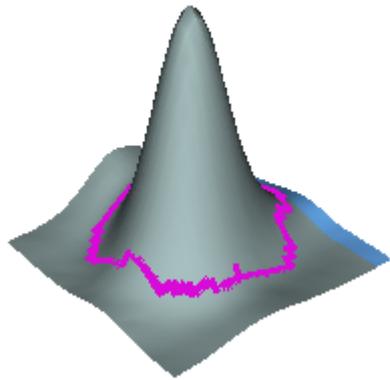


Abbildung 4.5.4: 3D-Ansicht des Proteinspots Nr. 1636 aus Gel Nr.1.

Nachdem die automatische Spot- Überlagerung/Matchen optimiert und per Hand überprüft worden war, erfolgte die statistische Auswertung. Dabei wurden Spots immer dann als relevant eingestuft, wenn sie im Stadt/Land-Vergleich im t-Test einen p-Wert von  $\leq 0,05$  aufwiesen. Es wurden 34 Proteinspots genauer analysiert. Die statistischen Werte sind aus Tabelle 4.5.1 ersichtlich.

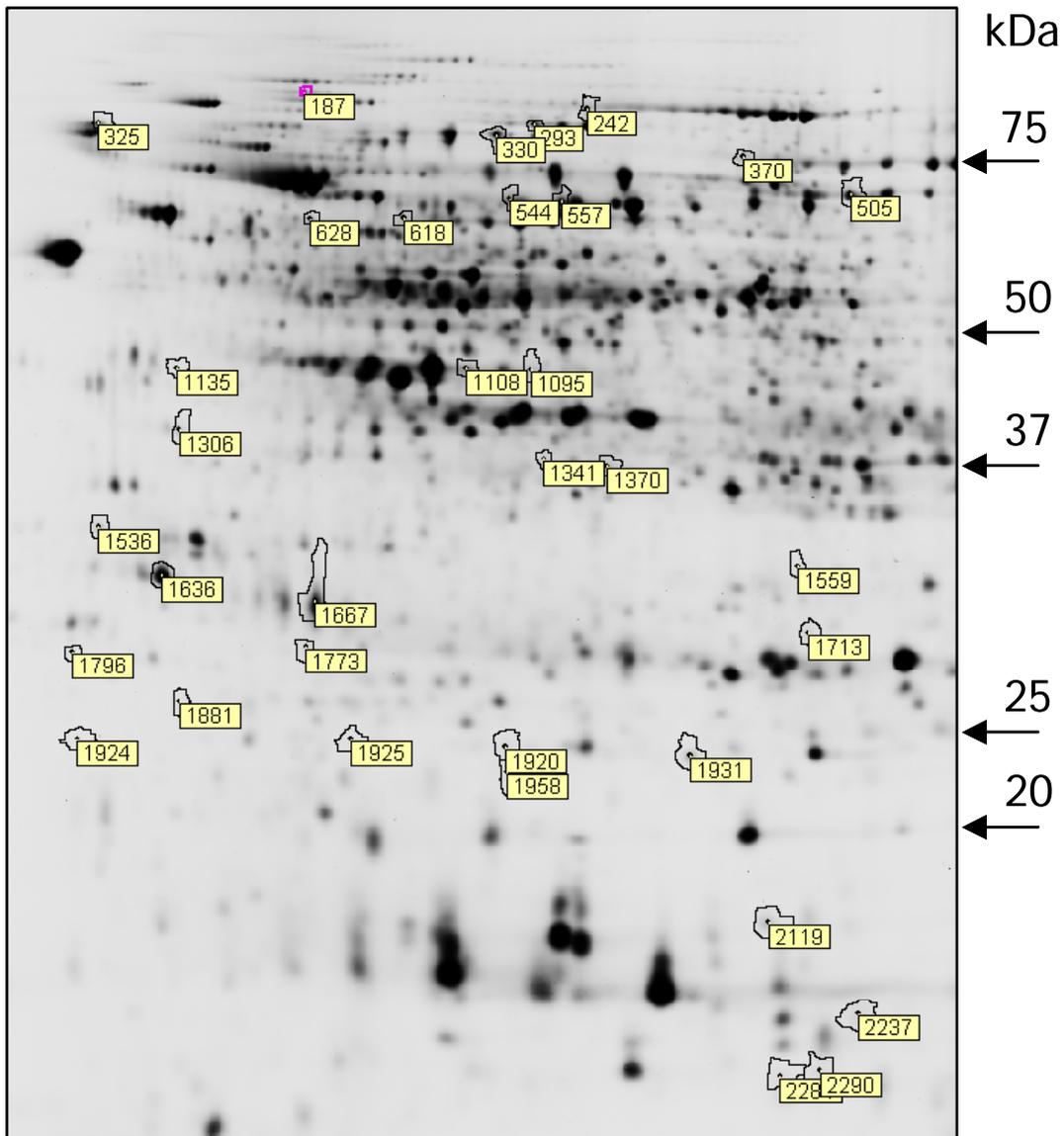


Abbildung 4.5.5: 2D Gel, Spots mit Positionsnummern sind im t-Test auf einem Signifikanzniveau von  $\leq 0,05$  zwischen Stadt- und Landgruppe unterschiedlich.

Tabelle 4.5.1: Spot-Tabelle (Eigenschaften der Spots): Nummer, Positionsnummer, Appearance, p-Wert im t-Test, Average-Ratio; mit DeCyder Software ausgewertet.

Spotnummer	Position	Appearance	t-test p	Average Ratio Stadt/Land
1	187	12 (12) A, M	0.0048	-1.35
2	242	12 (12) A, M	0.043	-1.38
3	293	12 (12) A, M	0.046	-1.40
4	325	9 (12) A, M	0.015	3.80
5	330	12 (12) A, M	0.015	7.83
6	370	12 (12) A, M	0.0046	-1.82
7	505	12 (12) A, M	0.00036	1.67
8	544	12 (12) A, M	0.0055	-4.11
9	557	12 (12) A, M	0.014	-6.96
10	618	12 (12) A, M	0.0087	-1.90
11	628	12 (12) A, M	0.0099	-1.36
12	1095	12 (12) A, M	0.012	1.45
13	1108	12 (12) A, M	0.048	1.25
14	1135	9 (12) A, M	0.0042	1.83
15	1306	12 (12) A, M	0.015	1.24
16	1341	12 (12) A, M	0.0038	4.47
17	1370	12 (12) A, M	0.0096	-4.69
18	1536	9 (12) A, M	0.042	2.00
19	1559	9 (12) A, M	0.020	2.02
20	1636	12 (12) A, M	0.011	1.14
21	1667	12 (12) A, M	0.018	-1.29
22	1713	12 (12) A, M	0.018	-1.70
23	1773	12 (12) A, M	0.014	-1.42
24	1796	9 (12) A, M	0.039	1.85
25	1881	9 (12) A, M	0.049	1.23
26	1920	12 (12) A, M	0.0055	-2.64
27	1924	12 (12) A, M	0.012	-3.20
28	1925	9 (12) A, M	0.0090	1.33
29	1931	12 (12) A, M	0.0082	1.20
30	1958	9 (12) A, M	0.030	-2.68
31	2119	12 (12) A, M	0.032	1.38
32	2237	12 (12) A, M	0.047	1.26
33	2284	12 (12) A, M	0.046	2.50
34	2290	12 (12) A, M	0.025	3.01

Eine Average-Ratio von +2 bedeutete ein im Mittel doppelt so hoher Proteinlevel in den „Stadtpollen“ gegenüber den „Landpollen“. Bei einer negativen Average-Ratio von -2 war das Protein in der Stadtgruppe im Mittel nur halb so hoch exprimiert wie in den Landproben. Fünfzehn Proteine in der Stadtgruppe waren gegenüber der Landgruppe herunterreguliert. Wohingegen 19 Proteine in der Stadtgruppe höher exprimiert waren. Der Spot mit der Masternummer 557 hatte die niedrigste Average-Ratio von -6,96 und der Spot mit der Masternummer 330 hatte mit einem Wert von 7,83 die höchste Average-Ratio, d.h. hier waren die größten Expressionsunterschiede zwischen den zwei Gruppen detektiert worden. Aber

---

auch geringere Proteinexpressions-Unterschiede mit einer 14%igen (Spot 1636) Hoch- oder einer 29%igen (Spot 1667) Herunter-Regulierung waren detektierbar. Ein Poolen der Pollen von den verschiedenen Bäumen in und um München wurde vermieden, um eine feinere Auflösung zu erhalten und Unterschiede zwischen den Bäumen sichtbar zu machen und somit die Uniformität der Proben besser abschätzen zu können. Dies hatte allerdings aufgrund der biologischen Varianz innerhalb einer Gruppe starke Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zur Folge. Für die detaillierte Aufschlüsselung der einzelnen regulierten Proteinspots half die graphische Darstellung zu den einzelnen Spots. Exemplarisch für diese Darstellung sind die sequenzierten Spots in Abbildung 4.5.6 aufgeschlüsselt gezeigt.

Graphische Darstellung der einzelnen Protein-Spots

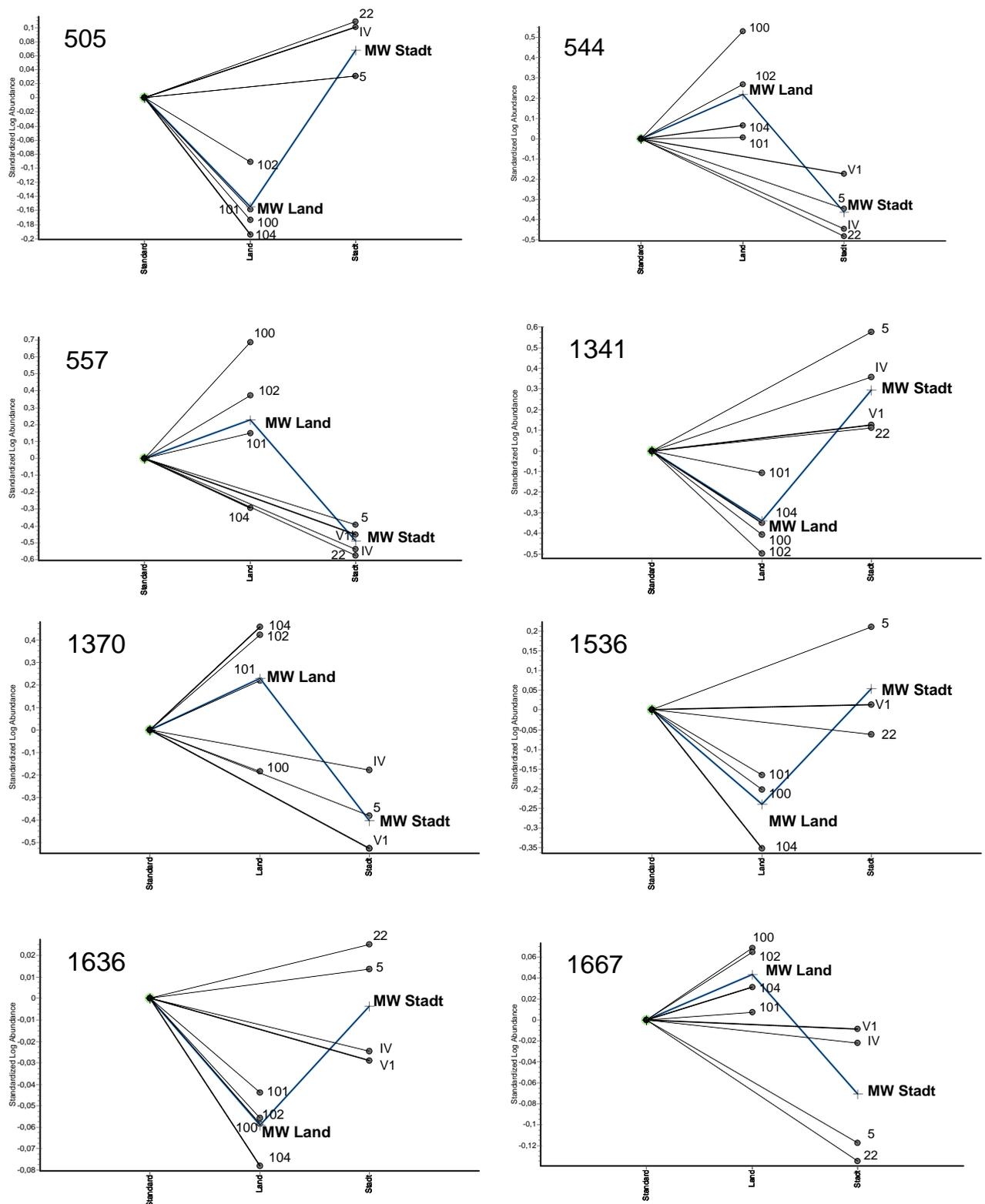


Abbildung 4.5.6: graphische Darstellung der sequenzierten Spots mit DeCyder. (Masstab unterschiedlich, je nach bester Darstellungsform gewählt). Getrennt nach den Gruppen: Land-Gruppe Standorte Nr. 100, 101, 102, 104 mit Mittelwert (MW Land) und Stadtgruppe Standorte Nr. 5, 22, IV, V1 mit Mittelwert (MW Stadt).

Es wurde deutlich, dass sowohl innerhalb der Landgruppe als auch innerhalb der Standgruppe Schwankungen im Expressionslevel auftraten (Abbildung 4.5.6). Trotzdem konnten noch mit einem Wert von  $p \leq 0,05$  im t-Test 34 Proteinspots als signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen herausgefiltert werden.

#### **4.5.4 Sequenzierung der Spots**

Von acht Proteinen wurden Peptidsequenzen analysiert (siehe Tabelle 4.5.2). Ein Protein konnte als 14-3-3 Protein identifiziert werden, da die Pollenpeptidsequenzen ausreichende Sequenzhomologien zum Protein 14-3-3 Protein 2 von Tomate (Accession Nummer P93208 in Datenbank SwissProt) aufwiesen. Hierbei handelte es sich um den Spot 1636. Der „Probability Based Mowes Score“ von 157 gab die nötige Absicherung an. Außerdem stimmt der mittels Internetdatenbank SwissProt ([http://ca.expasy.org/cgi-bin/pi\\_tool](http://ca.expasy.org/cgi-bin/pi_tool)) errechnete theoretische isoelektrische Punkt und das Molekulargewicht mit denen, des vom Gel ausgestochenen Spots, überein (siehe Abbildung 4.5.5).

Tabelle 4.5.2: Peptidsequenzen der sequenzierten Spots mittels MS/MS.

Spot Nr.	Sequenz	probability %	p/ experimental	MW (kDa) experimental
505	WANFTLEEQAK	84,83	6,58	75,0
505	VLDVAEDVCAR	100		
505	LDKLDYA	95,91		
544	WVGSGAGS	100	5,60	74,5
544	SVMNDREFLGQNDTLYAHSLR	100		
557	WENTNDASLFGK	91,22	5,74	74,5
557	CGNVEALHNSEYR	50,04		
557	NVVFLDGGMKG	68,70		
557	WVGSGAGSGSGAGFR	100		
557	FLGNQDTLYAHSLR	70,89		
1341	VATVSLPR	99,99	5,73	39,6
1341	PLVGEVGLDQTK	50,45		
1370	IRLEEK	100	5,75	37,0
	LGMAPTIPGARQLVNHR	100		
	SIALIQNSLDLSPREELPKHLTLNPFYK	100		
1536	HATDFVSWLQDELFTVTK	100	4,47	35,2
1636	EENVYMAK	100	4,65	31,6
1636	IISSIEQKEESR	100		
1636	AAQDIANTELAPTHPIR	100		
<b>1636</b>	Swiss-Prot accession no. P93208 14-3-3 Protein		4,72 (theoretical)	28,88 (theoretical)
1667	NFAYEKATETLR	94,24	5,08	30,0
1667	ATGDL	100		

## 5 Diskussion

Ausgehend von der Problematik stetig zunehmender Prävalenz allergischer Erkrankungen wurde in dieser Arbeit auf der Ebene des gesamten Pollens überprüft, ob seine Charakteristika durch Schadstoffeinfluss derart modifiziert werden, dass der Pollen sein allergenes Potential verändert.

### 5.1 Charakterisierung von Pollen auf RNA-Ebene

*Relative Quantifizierung von Expressionsunterschieden bezüglich unterschiedlicher Schadstoffexposition*

Diese Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Durner (Institut für biochemische Pflanzen-Pathologie, GSF, Neuherberg). Da das Birken genom noch nicht identifiziert wurde, konnte kein artspezifischer cDNA Mikroarray etabliert werden. Stattdessen wurde ein Array verwendet, der als Screeningverfahren für 700 Stressgene bei *Arabidopsis thaliana* verwendet wird. Zu erwarten war, dass nicht alle dieser Gen-Sonden ausreichende Sequenzhomologien mit Birken genen besitzen. Jedoch sind nicht alle Sonden *Arabidopsis*-spezifisch und genau diese Sonden waren es, die es ermöglichten 76 Gene, die mit Stressresistenz assoziiert sind, bei Birkenpollen zu identifizieren. Nur Genexpressionsunterschiede von größer +2 und kleiner 0,5 wurden als signifikant angesehen. Es gab keine signifikanten Genexpressionsunterschiede zwischen den Pollen aus der Stadtbirke am Luise-Kiesselbach-Platz und den Pollen von der Landbirke Nr. 104 aus dem Landkreis Freising. Die höchsten Expressionsunterschiede nach oben und nach unten lagen bei 1,7 und 0,8. Genexpressions-Unterschiede sind eventuell auf der Proteinebene bzw. bei anderen als den hier untersuchten Stressgenen zu erwarten.

Der Vorteil eines Mikroarray-Experimentes ist, dass viele Hunderte bis Tausende Genexpressionsunterschiede auf einmal analysiert werden können. Dies lässt jedoch keinen eindeutigen Rückschluss auf die tatsächlich vorhandenen Proteine in der Zelle zu. Deswegen setzten wir ein zweites Screeningverfahren, die 2D Elektrophorese ein, mit deren Hilfe auf Proteomebene relative Protein-Expressionsunterschiede zwischen verkehrsbelasteten Pollen und Landpollen untersucht wurden (Punkt 5.2).

## 5.2 Charakterisierung der Pollen auf Proteom-Ebene

### *Relative Quantifizierung von Expressionsunterschieden bezüglich unterschiedlicher Schadstoffexposition*

Diese Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Professor Görg in Weihenstephan (Fachgebiet Proteomik, TUM, Weihenstephan). Um den Effekt der Verkehrsemission auf das Pollenproteom untersuchen zu können, sollte sich die Einflussgröße Verkehrsbelastung deutlich zwischen den Gruppen unterscheiden. Hierfür wurden die Birkenstandorte vorab mittels Stadtplänen hinsichtlich Verkehrsknotenpunkten und durch Besichtigungen der Standorte sorgfältig ausgewählt. Um die genaue Belastung der Standorte zeitnah zur Pollensammelzeit festzustellen, wurde für die jeweiligen Standorte der Stickstoffdioxidgehalt als Indikator für die Höhe des Verkehrsaufkommens bestimmt. Weiterhin wurde ein Verkehrs-Score erstellt, in dem unter anderem die Nähe der Birke zu Straßen mitberücksichtigt wurde. Ein Poolen der Pollen von den verschiedenen Bäumen in und um München wurde vermieden, um eine feinere Auflösung zwischen individuellen Bäumen, untersuchen zu können. Dies hatte allerdings, aufgrund der biologischen Varianz innerhalb einer Gruppe (Stadtgruppe und Landgruppe), Unterschiede in der Proteinexpression zu bedeuten. Auf die biologische Varianz können mehrere biotische und abiotische Einflussfaktoren z.B. genetischer Hintergrund der Bäume, Reifegrad der Pollen, Bodennährstoffe, Wasserversorgung u.s.w. einwirken.

Der Vorteil der 2D Elektrophorese ist, dass Tausende Proteinspots auf einmal analysiert werden können. Mit der neuen Technologie der „difference Gelelektrophorese“ (DIGE) und der Auswerte-Software DeCyder (Amersham Bioscience) wird die relative Quantifizierung von Proteinspots ermöglicht. Der wesentliche Vorteil der DIGE-Methode liegt unter anderem an der Markierung der Proben mit unterschiedlich anregbaren Fluorophor-Markern (CyDys), wodurch mehrere Proben in dem selben Gel aufgetrennt werden können. Der Farbstoff bindet kovalent an Lysin, wobei der isoelektrische Punkt des Proteins nicht verändert wird, da die CyDys selbst eine positive Ladung mitbringen und den Verlust der einfach positiven Ladung des Lysis durch die CyDye-Bindung wieder ausgleichen. Aufgrund des in jedem Gel mitlaufenden internen Standard, der sich aus gleichen Teilen aller zu analysierenden Proben zusammensetzt, werden die

methodischen Varianzen vernachlässigbar. Auf jedem Gel laufen zusätzlich zum internen Standard zwei Proben (Land und Stadt) mit, jede zum selben Zeitpunkt mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Dies erleichtert und präzisiert die Spotabgleichung (Matchen). Zusätzlich gleicht das Softwarepaket DeCyder (Amersham Biosciences) die Gel-zu-Gel-Variationen anhand des Standards ab. Weitere bedeutende Vorteile dieser DIGE-Technologie sind außerdem ihre hohe Sensitivität und Linearität bei der Spotintensitätsbestimmung. Aufgrund des hohen Materialeinsatzes (100 mg Pollen pro Probe) wurde auf eine Markierung der Gruppen einmal mit dem einen und einmal mit dem anderen Farbstoff verzichtet. Bei mehreren Studien ist dieser verwendete Versuchsaufbau kontrolliert worden, wobei keinerlei Unterschiede aufgrund der unterschiedlichen Anregungen der Fluorophor-Marker festgestellt werden konnte (van de Bergh et al. 2003).

Obwohl die Birkenpollen von weit auseinander gelegenen Standorten gesammelt wurden und somit von einer Standortvarianz nicht nur aufgrund der Schadstoffkonzentration in der Luft, sondern auch aufgrund anderer Standortparameter ausgegangen werden musste, konnten 34 Proteinspots identifiziert werden, die sich zwischen den Gruppen Land versus Stadt signifikant anhand des Average-Ratio mit einem  $p$  von  $= 0,05$  analysiert im t-Test unterschieden. Dies ist umso bemerkenswerter, da deutlich wurde, dass sowohl in der Landgruppe als auch innerhalb der Stadtgruppe erhebliche Schwankungen im Expressionslevel auftraten. Da sich beide Gruppen signifikant in ihrer Stickstoffdioxidbelastung unterschieden, kann von einem starken Einfluss der Verkehrsbelastung auf die Pollen ausgegangen werden, was die Vermutung zulässt, dass ein starker Zusammenhang zwischen den Expressionsunterschieden der 34 Proteine und der jeweiligen Exposition bestand. Für die sequenzierten Peptide der Proteinspots 505, 544, 577, 1341, 1370, 1536 und 1667 fehlen öffentliche Datenbanken von Birkenproteinen, um durch Sequenzhomologien die Proteine eindeutig bestimmen zu können. Das identifizierte 14-3-3 Protein, das in der Stadtpollen-Gruppe mit 14% höher exprimiert war, wird in der Literatur als ein Regulatorprotein der Signaltransduktion beschrieben (Roberts et al. 2002, Ferl 1996, 2004). Vermutlich konnte dieses Protein nur mittels der in dieser Studie verwendeten neuen DIGE Technologie zur Quantifizierung von Proteinen mit Kombination des Auswertepakets DeCyder identifiziert werden. Denn nur mit dieser Methode ist es möglich, zuverlässig auch kleine Intensitätsunterschiede zu

detektieren (Tonge et al. 2001, Ünlü 1999, van de Bergh et al. 2003). Eingehende Literaturrecherchen ergaben, dass das 14-3-3 Protein zu einer ubiquitär vorkommenden Proteinfamilie gehört. Ihre Funktion liegt in der direkten Interaktion mit Zielproteinen, welche z.B. Zelldifferenzierung und Signaltransduktion regulieren (Finnie et al. 1999, Aitken 2002, Ferl 1996). Zahlreiche Isoformen dieses Proteins sind bisher in Eukaryonten identifiziert worden (Rosenquist 2000). In Pflanzen werden die Enzyme Nitratreduktase und Saccharose-Phosphatsynthetase vom 14-3-3 Protein reguliert (Kaiser und Huber 2001). Diese Enzyme nehmen eine Schlüsselstellung im Nitratmetabolismus und Kohlenhydratmetabolismus der Pflanze ein (Comparot et al. 2003). Andere Zielproteine von 14-3-3 Protein sind dagegen wichtig zur Regulierung von oxidativem Stress wie z.B. Ascorbat-Peroxidase (Zhang et al. 1997). Auch die H<sup>+</sup>-ATPase, die den elektrochemischen Gradienten entlang von Membranen aufrechterhält, wird durch dieses Protein reguliert (de Boer 2002). Bei mehreren Stressvorgängen ist das 14-3-3 Protein beteiligt (Roberts et al. 2002, Sehnke et al. 2002), so z.B. wird es in zahlreichen Pflanzen durch äußere Stimulantien, wie z.B. Kältestress (Jarillo et al. 1994, Chelysheva et al. 1999), Pathogenbefall (Roberts und Bowles 1999, Brandt et al. 1992, Yan et al. 2002, Finnie et al. 2002) hochreguliert. 14-3-3 Protein bindet an phosphoryliertes Serin oder Threonin (Finnie et al. 1999, Yaffe 2002). Die direkte Interaktion des Proteins mit seinen Zielproteinen spricht für die Funktion eines molekularen Schalters, der schnell von einem Metabolismus zum anderen umschalten kann, in Reaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen (Finnie et al. 1999). Bei Stress wird dieses Protein hochreguliert (Roberts et al. 2002). Dies würde für die These sprechen, dass „Stadtpollen“ durch die höhere Verkehrsbelastung und den dadurch bedingten Stress das genannte Protein hochregulieren.

### **5.3 Einfluss von Umweltfaktoren auf die Bioverfügbarkeit von Polleninhaltsstoffen**

Voraussetzung für die *in vitro* Untersuchungen des Umwelteinflusses auf Pollen war, dass die Expositionsbedingungen der Pollen genau definiert waren, besonders im Hinblick auf die Allergotoxikologie (Behrendt et al. 2001a). Ihr Forschungsschwerpunkt liegt unter anderem in der Identifizierung von

Schadstoffen, die Pollen in ihrer Allergenität bzw. der Bioverfügbarkeit von Allergen und PALMs modifizieren. Dies soll wiederum zu Richtlinien führen, die die Emission von relevanten Schadstoffen stärker reglementieren.

Zwei unterschiedliche Expositions-Ansätze zur Untersuchung des Einflusses von Umweltfaktoren auf allergene Pollen wurden gewählt. Zum einen wurden Pollen gezielt mit verschiedenen Schadstoffen in Wirbelschichtreaktoren exponiert. Der Vorteil bei dieser Methode liegt in der guten Kontrollierbarkeit der äußeren Einflüsse, so dass gezielt Schadstoffe bezüglich ihres Potentials, Pollen zu modifizieren, untersucht werden können (siehe Punkt 5.3.2).

Beim zweiten Ansatz wurden Pollen direkt von der Mutterpflanze gesammelt. Dabei wurde auf eine möglichst genaue Bestimmung der Expositionsbedingung der Birken großen Wert gelegt. Deswegen wurden Birken entweder nahe einer LfU Messstation ausgewählt, oder es wurde explizit NO<sub>2</sub> als Indikator für Verkehrsbelastung am Birkenstandort mittels Passivsammler bestimmt (Punkt 5.3.3).

### **5.3.1 Einfluss der Extraktionsmethode auf die Bioverfügbarkeit von Polleninhaltsstoffen**

*Vergleich zu anderen Studien - mit dem Schwerpunkt, den Einfluss von Umweltschadstoffen zu erläutern*

Für die Diskussion von Arbeiten mit Schwerpunkt des Schadstoffeinflusses auf Pollen ist es wichtig, genau die Extraktionsbedingungen zu kennen, um die Ergebnisse in Relation sehen zu können, da davon die Bioverfügbarkeit der Polleninhaltsstoffe abhängt (Behrendt et al. 2001, Carnés et al. 2002, Cadot et al. 1995). Zum Beispiel wurden in der Arbeit von Huss-Marp (2000) zwei Extraktionspuffer verglichen. Wie zu erwarten, wurden aus 20 mg Pollen in einem Salzpuffer von 1 ml Ammoniumbicarbonat (pH 8) mehr Protein freigesetzt als durch einen Extrakt mit 1 ml Wasser. Weiterhin war in der genannten Studie in beiden Extrakten die extrahierbare Menge an Protein abhängig von der Inkubationszeit der Pollen mit den Puffern. Nach 150 Minuten Expositionszeit war bereits der maximale extrahierbare Proteingehalt messbar. Dies war für alle untersuchten Pollenarten, Hasel, Erle, Birke, Honiggras und Beifuß, der Fall. Vom Autor wurde argumentiert, dass die Modulation der Proteinfreisetzungskinetik

durch Schadstoffeinfluss am besten nach 30 Minuten erkennbar sein dürfte, da hier in der Regel noch nicht alles Protein extrahiert ist und Variationsmöglichkeiten in der Bioverfügbarkeit des Proteins von mehr oder weniger durch den Schadstoffeinfluss messbar würden. Auch in dieser Arbeit wurden zwei Extrakte miteinander verglichen: Ammoniumbicarbonat-Puffer versus RPMI Extrakt. Der erste Extrakt ist optimal für die  $\beta$  v 1-Messungen der zweite Extrakt hingegen ist für die Versuche mit humanen Zellen geeignet. Die Extraktionsdauer beim ersten Extrakt betrug vier Stunden im Dunkeln bei RT und die eingesetzte Pollenmenge 5 mg in 1 ml Ammoniumbicarbonatextrakt. Beim zweiten Extrakt wurden 10 mg Pollen für dreißig Minuten bei 37°C in 1 ml RPMI-Medium inkubiert. Dies ermöglichte sowohl Untersuchungen zur maximal freigesetzten Menge an Polleninhaltsstoffen, als auch die Beurteilung des Einflusses von Schadstoffen auf eine Änderung der Freisetzungskinetik, mit der Vergleichs-Einschränkung, dass es sich um zwei unterschiedliche Extrakte handelte. Die Beziehung zwischen der Volumenmenge und der Menge an Pollen wurde als linear angenommen, so dass der Gehalt an Substanzen im Ammoniumbicarbonatpuffer zu statistischen Vergleichszwecken von 5 mg auf 10 mg Pollen verdoppelt wurde. Für Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs) wurde die Linearität durch mehrere Versuche bestätigt (Kasche 2002). Kasche (2002) untersuchte die Freisetzung von Pollen-assoziierten Lipidmediatoren in Abhängigkeit von pH-Werten und den Extrakten PBS und RPMI-Medium. Bei einem pH-Wert von 7,4 wurden mehr PALMs im PBS-Extrakt messbar. In den Untersuchungen zum Einfluss der Inkubationszeiten der Pollen mit den Extraktionsmittel zeigte sich, dass die Freisetzung der Substanzen schnell erfolgte. Nach 10 Minuten wurden über 70% der Pollen-assoziierten Lipidmediatoren freigesetzt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit der Pollen mit den jeweiligen Extrakten war nur noch ein minimaler Anstieg der PALMs zu verzeichnen. In der vorliegenden Arbeit wurde auf diese Daten zurückgegriffen und keine Zeitreihen mehr erstellt. Vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Extrakte erhöhte sich die Bioverfügbarkeit der PALMs jedoch um das dreifache, wenn die Pollen statt nur eine halbe Stunde vier Stunden im Extraktionsmittel inkubiert wurden. Auch bei der Proteinmenge war nach einer halben Stunde noch keine Sättigung erreicht, da nach vier Stunden ein doppelt so hoher Gehalt an Protein messbar wurde. Eine zeitabhängige Freisetzung an Proteinen beschreibt Huss-Marp (2000) mit einem Anstieg der Proteinmenge bis

ungefähr 150 Minuten Inkubationsdauer. Beim Vergleich der zwei Inkubationszeitpunkte in der vorliegenden Arbeit konnte auch eine Proteinzunahme verzeichnet werden. Nach einer vierstündigen Inkubation von *Betula*-Pollen lag die extrahierbare Proteinmenge um den Faktor 1,45 und bei *Phleum*-Pollen um den Faktor 1,34 erhöht.

### 5.3.2 *In vitro* Expositionen - Einfluss von Luftschadstoffen auf Pollen

#### Auswahlkriterien für die Schadstoffe

Pollen wurden *in vitro* in Wirbelschichtreaktoren mit SO<sub>2</sub>, Partikeln oder VOCs exponiert, um den Schadstoff-Einfluss auf allergene Pollen zu untersuchen. Der Vorteil dieser Wirbelschichtreaktoren, gegenüber ursprünglichen Expositionsanlagen (Ruffin et al. 1986 und Thomas et al. 1997) ist der, dass die Pollen während der Exposition in Schwebelage gehalten werden. Dadurch wird erreicht, dass die Pollen einer gleichmäßigen Schadstoffexposition von allen Seiten ausgesetzt sind. Um aussagekräftige Effekte erzielen zu können, waren die eingesetzten Konzentrationen der Gase an maximale Arbeitsplatzkonzentrationen - den sogenannten MAK-Werten - orientiert, welche definitionem deutlich über den in Deutschland zu messenden Umwelt-Konzentrationen liegen. Die Pollen wurden mit Schwefeldioxid mit einer Konzentration von 10 MAK (13 mg/m<sup>3</sup>, 16 Stunden) und mit dem Toluol-m-Xylol-Gemisch bei 1 MAK (bezogen auf Toluol 200 mg/m<sup>3</sup>, 6 Stunden) exponiert. In der vorliegenden Arbeit wurden für die *in vitro* Expositionen kommerzielle Birkenpollen (*Betula verrucosa*) und Graspollen (*Phleum pratense*) eingesetzt, die aus dem Wachstumsjahr 2001 stammten.

#### *Schwefeldioxid*

Es erfolgten Expositionen von *Betula verrucosa*-Pollen mit Schwefeldioxid bei verschiedenen Luftfeuchten. Die Bedeutung dieses Schadstoffes wurde in der deutschlandweiten Ost-West-Vergleichsstudie deutlich (Krämer et al. 1999), die kurz nach dem Mauerfall unternommen wurde. Es waren Unterschiede im Gehalt von Umweltschadstoffen, darunter eine erhöhte Konzentration an Schwefeldioxid im Osten im Vergleich zum Westen vorhanden. Dies könnte erklären, warum trotz identischem genetischem Hintergrund der Untersuchungsgruppen im Osten vermehrt unspezifische Entzündungen der oberen Atemwege sowie atopisches

Ekzem diagnostiziert wurden, wohingegen im Westen vermehrt allergische Rhinokonjunktivitis auftraten (Ring et al. 1999, Nicolai et al. 1997). Zudem sorgte Schwefeldioxid als Luftschadstoff vor allem in den 80er Jahren für öffentliches Aufsehen. Der saure Regen war verantwortlich für versäuerte Gewässer sowie Schäden an Pflanzen und Gebäuden. Zahlreiche Untersuchungen zu diesem Thema, auch im Hinblick auf Pollen, sind veröffentlicht worden (Munzuroglu et al. 2003, Bellani et al. 1997, Ma et al. 1976, Linskens et al. 1985, Kappler und Kristen 1987). Übereinstimmend in diesen Studien wurden negative Effekte auf das Pollenschlauchwachstum festgestellt (Munzuroglu et al. 2003, Bellani et al. 1997, Ma et al. 1976, Linskens et al. 1985, Kappler und Kristen 1987). Seit dem Einbau von Rauchgas-Entschwefelungsanlagen hat in Deutschland die Schwefeldioxidkonzentration in der Luft deutlich abgenommen. Eine Überschreitung des Schwellenwertes von  $410 \mu\text{g}/\text{m}^3$  für mehr als eine Stunde wurde im Jahr 2003 in Bayern nicht mehr gemessen (Jahresbericht LfU 2003).

#### *Flüchtige organische Substanzen*

Das in dieser Studie untersuchte Gras *Phleum pratense* wächst häufig an Straßenrändern und dessen Pollen sind dadurch hohen Verkehrsbelastungen ausgesetzt. Deswegen wurden *Phleum pratense*-Pollen mit einem 3:2 Gemisch aus Toluol und m-Xylol, wie es typischerweise von Kraftfahrzeugen nach der Verbrennung von Benzin freigesetzt wird, exponiert. Die Konzentrationen wurden an den MAK-Werten ausgerichtet. Die umweltrelevante Konzentration von Toluol lagen 2003 gemessen am Karlsplatz (München) bei durchschnittlich  $9,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Jahresbericht LfU 2003) und somit ca. zwanzigtausendfach geringer als den im Wirbelschichtreaktor eingesetzten Konzentrationen.

#### *Feinstaub*

Partikel in der Luft haben in den letzten Jahren vermehrt an wissenschaftlichem Interesse gewonnen. Nicht nur seit dem Bekanntwerden ihrer krebserregenden Eigenschaften (Pope et al. 2002) sondern auch durch ihre adjuvanten Effekte zur Allergieentstehung (Diaz-Sanchez et al. 1999, Riedl et al. 2005, Bernstein et al. 2005). Auch die Öffentlichkeit ist bezüglich dieses Themas sensibilisiert worden, bedenkt man nur die Diskussionen um den Einbau von Russfilteranlagen in Kraftfahrzeugen. Da bereits deutliche Hinweise auf die adjuvante Wirkung

besonders von Dieselpartikel sowohl in Tiermodellen als auch bei Expositionsversuchen an Patienten erhalten wurden (Whitekus et al. 2002, Diaz-Sanchez 1997, Diaz-Sanchez et al. 1999), ist bei den *in vitro* Expositionen mit den Wirbelschichtreaktoren die Konzentration von Feinstäuben in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen durchgeführt worden. Die in den jeweiligen Versuchen eingestellte Konzentration von  $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$  Feinstaub entspricht umweltrelevanten Konzentration an verkehrsreichen Tagen (Kappos et al. 2004).

### Modifikationen von Pollen durch den Einfluss von Schadstoffen

Im folgenden werden Ergebnisse aus relevanten Studien zur Untersuchung des Einflusses von Schadstoffen auf *in vitro* exponierte Pollen mit denen in dieser Studie erzielten Ergebnisse diskutiert. In den meisten Expositionsstudien wurden jeweils der Proteingehalt und die Allergenität des Pollens untersucht, so dass bezogen auf diese Parameter Vergleiche zwischen den einzelnen Studien möglich sind. Die auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) sind jedoch erst 1997 von Behrendt et al. beschrieben worden.

### *Schwefeldioxid und Luftfeuchte*

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Schwefeldioxid (10 MAK, Expositionsdauer 16 Stunden) bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten (30%, 50%, 70%) an *Betula verrucosa*-Pollen untersucht. Diese Ergebnisse können mit den Versuchen von Huss-Marp (2000) verglichen werden. In Huss-Marps Studie zeigte sich der Einfluss der relativen Luftfeuchte (0%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, Expositionsdauer 9 Stunden) und des Schwefeldioxides ( $13100 \mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$ ) am stärksten bei Spätblühern wie Beifuß- und Honigwollgraspollen, da hier der Proteingehalt mit Zunahme der Luftfeuchte abnahm. Dieser Luftfeuchte-Effekt wurde jedoch durch Schwefeldioxid reduziert. Mit steigendem Schwefeldioxid-Gehalt war demnach die Abnahme des Protein-Gehaltes nicht mehr so deutlich. Spekulierte wurde in diesem Zusammenhang, dass pollenphysiologische Schädigungen bei Graspollen diese Befunde auslösen könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass Schwefeldioxid negative Effekte auf die Pollenphysiologie haben konnte, da es das Pollenschlauchwachstum hemmt (Kappler und Kristen 1987). Der Einfluss von Schwefeldioxid in der vorliegenden Arbeit war ausschließlich bei

den vier Stunden-Extrakten bei relativen Luftfeuchten von 30% und 70% statistisch signifikant. Schwefeldioxid führte bei Birkenpollen bei einer relativen Luftfeuchte von 30% zu einer Reduktion des Proteingehaltes. Bei dem vier Stunden Extrakt stieg zudem bei einer 70%igen relativen Luftfeuchte der Allergengehalt von Bet v 1. Der Proteingehalt sank zwar auch bei diesen Versuchsbedingungen um ca. 6% ab, dies war aber nicht mehr statistisch signifikant. Eventuell liegt dies an den kleinen Versuchszahlen, bei der Ausreißer nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Auch in weiteren *in vitro* Studien (Ruffin et al. 1986), bei denen allerdings die Einschränkung vorlag, dass hier die Exposition der Pollen nicht von allen Seiten gleichmäßig erfolgte, wurde der Einfluss von Schwefeldioxid auf verschiedenen Pollen untersucht. Es zeigte sich, dass die Exposition von *Quercus rubra*-, *Festuca elatior*- und *Ulmus pumilar*-Pollen mit Schwefeldioxid die Zusammensetzung an freien Aminosäuren veränderte (Ruffin et al. 1986). Behrendt et al. (1997) konnten bei *Phleum pratense*-Pollen exponiert mit Schwefeldioxid ( $16500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) zeitabhängig (0; 1,5; 3; 6; 9 Stunden) bei einer relative Luftfeuchte von 80% eine Reduktion des Allergens Phl p 5 nachweisen. Denkbar wäre, dass bei hohen Luftfeuchten Proteine aus Pollen herausgelöst werden, und bereits als Aerosol in die Luft gelangen, was zu einer Reduktion des Gesamtproteins im Pollen selber führen würde.

Der Einfluss von Schwefeldioxid scheint eventuell unterschiedlich auf Phl p 5 und Bet v 1 zu wirken. Bet v 1 scheint als Stressprotein bei *Betula*-Pollen (Breiteneder et al. 1989) bei hohen Luftfeuchten und Einfluss von Schwefeldioxid höher exprimiert zu werden, sei es durch die höhere Luftfeuchte und den daraus resultierendem Stimulus für vermehrte Stoffwechselaktivität im Pollen oder aber es könnte auch sein, dass Phl p 5 besser wasserlöslich ist und dadurch leichter an die Umwelt abgegeben wird als Bet v 1.

#### *Feinstäube und VOC-Gemische*

Risse (2000) konzentrierte sich in seiner Studie darauf, den Einfluss von komplexen VOC-Gemischen und Feinstaub auf *Phleum pratense*-Pollen zu analysieren. Dabei kam es zu einer Erhöhung der Proteinfreisetzung um 5-12% bei schadstoffexponierten Pollen (Expositionsdauer 4 h, 50% rF, Tunnelstaub 1-2 mg Staub/ $\text{m}^3$ , VOC-Gemisch  $200 \text{ mg}/\text{m}^3$ ), der jedoch nicht bei allen

Expositionsversuchen gleich ausgeprägt war. Signifikante Erhöhungen der PALMs durch VOCs oder Feinstäube hingegen waren erst bei einer Einwirkzeit der Schadstoffe von 18 Stunden, nicht jedoch nach einer vier Stunden-Exposition signifikant.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei *Phleum pratense*-Pollen ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge durch eine Exposition bei 1 MAK von Toluol-m-Xylol-Gemisch mit einem Verhältnis von 3:2 (50%rF, Expositionsdauer 6 Stunden) festgestellt werden. Diese Pollenmodifikationen konnten jedoch nicht bei Expositionen mit Partikel ( $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , Expositionsdauer 6 Stunden, 50% rF) erzielt werden. Ein Einfluss von sechs Stunden schien nicht ausreichend zu sein, um Pollenmodulationen bezüglich der PALMs beobachten zu können. Für die Proteingehalt-Modifikationen scheint die Beschaffung und Konzentration der Partikel von Bedeutung zu sein. Risse (2000) setzte Tunnelstaub (Österreich) in zehnfach höheren Konzentrationen ein, als der in der vorliegenden Arbeit verwendete Staub aus amerikanischen Großstädten (NST 1648).

*Betula*-Pollen reagierten sensibler - bereits nach einer vierstündigen Partikelexposition kam es zu einer signifikanten Reduktion von PALM<sub>PGE2</sub> und Bet v 1. Nicht alle Pollenarten scheinen demnach mit dem gleichen Reaktionsmuster auf Schadstoffe zu reagieren.

### **5.3.3 *In vivo* Expositionen - Einfluss von Umweltbedingungen auf Pollen**

Bei den in München gesammelten Birkenpollen war es möglich, Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Polleninhaltsstoffen zwischen den einzelnen Standorten bzw. zwischen den jeweiligen Birken zu analysieren. Deutliche Schwankungen zwischen den Birken verschiedener Standorte waren sowohl im Gehalt an Protein als auch in der Menge der PALMs zu sehen.

#### Möglichkeiten des Einflusses von äußeren Bedingungen auf Pollen

Unterschiedlicher Boden in Bezug auf den Gehalt von Schwermetallen scheint zwar einen Einfluss auf das Äußere der Birken zu haben, da in hochbelasteten Gebieten die Birken kleinwüchsiger und eher strauchartig wuchsen, jedoch für die Birkenpollenentwicklung nicht von entscheidender Bedeutung zu sein (Kozlov und Zvereva 2004). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass der

Allergengehalt von Bet v 1 in Pollen sowohl abhängig war von der Außentemperatur als auch von den Lichtverhältnissen unter denen die Pollen wuchsen (Hjelmroos et al. 1995, Helander et al. 1997, Ahlholm et al. 1998). Da die Pollen in der vorgelegten Studie direkt von der Mutterpflanze gesammelt wurden, sind die Expositionsbedingungen realistisch, die Einflussfaktoren jedoch vielfältig. Es ist äußerst schwierig bei biologischen Proben alle Faktoren zu kontrollieren. Um zusätzliche Schwankungen zum beabsichtigten Unterschied in Bezug auf die Verkehrsbelastung so gering wie möglich zu halten, wurden Standards erstellt: Die Pollensammlung wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Sobald der Pollenflug sein Maximum erreicht hatte, wurden bei trockenem Wetter, Pollen auf der Südseite des Baumes in einer Höhe von 1,5 - 2 m gesammelt. Auch die Pollengewinnung aus den Birkenkätzchen erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Gewächshaus.

#### Einfluss der Einwirkdauer der Schadstoffe bezüglich der Pollenmodifikationen

Es ist nicht bekannt, in welchem Entwicklungsstadium der Pflanze oder des Pollens Luftschadstoffe den stärksten Einfluss haben. Die Überlegung in dieser Studie war daher, den Einfluss des Mittelwertes der jeweiligen Schadstoffkonzentration vom Mai des Vorjahres zum April des nachfolgenden Sammeljahres zu bestimmen, d.h. ein ganzes Expositionsjahr zu berücksichtigen. Die Messung der Stickstoffdioxidkonzentration mittels Passivsammler hingegen erfolgte zur Pollensaison für eine Woche im April. Demnach wurde ein kurzer Zeitraum des Stickstoffdioxid-Einflusses analysiert, der vornehmlich zur Charakterisierung des Standortes (hoch- bzw. niedrig-belastet mit verkehrsbedingten Emissionen) diene.

#### Einfluss der gemessenen Luftschadstoffe auf die Polleninhaltsstoffe

In der GINI PLUS Studie, bei der deutlich mehr Münchner Standorte und zusätzliche Standorte aus dem Ruhrgebiet analysiert wurden, zeigte sich eine Erniedrigung der PALM<sub>LTB4</sub>-Konzentrationen der Pollen von Bäumen, die weiter als 150 m von einer verkehrsreichen Straße entfernt standen (Kasche et al. 2005). Bei gesammelten *Phleum*-Pollen wurde dieser Zusammenhang ebenso festgestellt (Behrendt et al. 2001). Die in dieser Arbeit nicht signifikanten Korrelationen zwischen den Schadstoff-Daten und der Polleninhaltsstoffe könnte

darauf zurückzuführen sein, dass die Anzahl der untersuchten Bäume zu gering für eine statistisch signifikante Aussage war. In der vorliegenden Studie war der stärkste Einfluss der Umweltparameter tendenziell auf die Bioverfügbarkeit von PALM<sub>LTB4</sub> festzustellen. Von den Umweltmessdaten des LfU (CO, SO<sub>2</sub>, NO, NO<sub>2</sub> und Feinstaub) besitzen die Stickstoffverbindungen das höchste Potential, um die Pollencharakteristik zu modulieren. Verkehr, als anthropogene Quelle für Stickstoffverbindungen, ist in diesem Zusammenhang wichtig. Franze et al. (2003, 2004) zeigten, dass Proteine durch Stickstoffoxide nitriert werden. Beim Vergleich mehrerer Studien wird deutlich, dass auch andere Pollenarten stark auf Verkehrsbelastung reagierten. Demnach konnte z.B. in Teheran in mehreren Untersuchungen bei *Canna indica*-Pollen gezeigt werden, dass deutliche Veränderungen zwischen hoch verkehrsbelasteten und gering verkehrsbelasteten Pollen auftraten (Majd et al. 2004). So wurden im Immunoblot Modulationen durch Schadstoffe von belasteten *Canna indica*-Pollen deutlich, da hier zwar weniger, dafür aber andere Allergen-Banden im Blot auftauchten im Vergleich zu gering belasteten Pollen. Zudem wurde in interdermalen Haut-Testungen bei sensibilisierten Mäusen eine erhöhte Haut-Reaktivität auf Extrakte von *Canna indica*-Pollen aus belasteten Gebieten festgestellt. Dies zeigte, dass Pollen durch Modulationen der Proteinzusammensetzung eine höhere Allergenität aufweisen können. In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten allergischen Symptomen und der Nähe zu verkehrsreichen Straße festgestellt werden (Ishizaki et al. 1987, Keil et al. 1996, Brunekreef et al. 1997, Krämer et al. 2000, Venn et al. 2005). Cortegano et al. (2004) zeigten, dass auch in Madrid bei *Cypressus arizonica*-Pollen sich eine zusätzliche Protein-Bande im Immunoblot bei Extrakten aus Pollen von verkehrsreichen Gebieten nachweisbar war.

Die deutlichen Effekte können zum einen an den Pollenarten, die eventuell sehr sensibel auf Umwelteinflüsse reagieren und zum anderen aber an den hohen Schadstoffkonzentrationen in den genannten Großstädten liegen, was den Unterschied zu der vorgelegten Arbeit verdeutlicht.

#### **5.3.4 Ist der Einfluss von Umweltschadstoffen artspezifisch ?**

Pollenarten können auf Umwelteinflüsse unterschiedlich sensibel reagieren. Dies kann mehrere Gründe haben: Zum einen kann es von dem genetischen

Hintergrund abhängen, in welchen Ausmaß auf Stress durch Umverteilung von Energie („resource-allocation“), es z.B. zum Ausbilden verschiedener Abwehrmechanismen kommen kann. Es muss zu einem „Trade-Off“ zwischen arterhaltenden Funktionen und Verteidigungsmechanismen kommen (Begon et al. 2000).

Sowohl aus der Literatur als auch bei den hier durchgeführten Analysen wurde deutlich, dass es zwischen den Pollenarten Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Inhaltsstoffen gab (Ruffin et al. 1986). Artunterschiede wurden z.B. bei *Betula*-Pollen im Vergleich zu *Phleum*-Pollen gefunden, da *Betula*-Pollen deutlich mehr PALM<sub>PGE2</sub> als PALM<sub>LTB4</sub> freisetzen. Bei *Phleum*-Pollen war das Verhältnis genau umgekehrt. Interessant wäre es, den Umweltaspekt bezogen auf den Gehalt an PALMs innerhalb der Frühjahrsblüher (Bäumen) bzw. den Sommerblühern (Gräsern) zu untersuchen, da verschiedene Arten unterschiedlich sensitiv auf Umwelteinflüsse reagieren.

Die Pflanzen passen sich optimal an ihre jeweiligen Umweltbedingungen an. Bezogen auf die Frühblüher und die Sommerblüher sind vor allem die Wetterbedingungen sowie die Schadstoffkonzentrationen jahreszeitlich bedingt unterschiedlich. So ist es im Frühjahr noch deutlich kühler und die relative Luftfeuchte sehr gering. Zudem wird während der Heizperiode vermehrt Schwefeldioxid freigesetzt, was negative Auswirkungen auf das Pollenschlauchwachstum haben kann (Munzuroglu et al. 2003, Bellani et al. 1997). Auch wird im Frühjahr der Stoffwechsel der Pflanzen wieder aktiv. Der Einfluss eines Schadstoffes ist vermutlich in der Wachstumsperiode am größten. Da Bäume ihre Pollen im Gegensatz zu den Gräsern früh im Jahr entlassen, ist im ersten Fall die kontinuierliche Einwirkungszeit der Schadstoffe auf die Mutterpflanze nach der Winterpause, zu Beginn des Pflanzenwachstums (hoher Stoffwechsel), geringer, was zu unterschiedlichen Anpassungsmechanismen der Pflanzen führen könnte. Gräser wachsen unter anderem an Straßenrändern und werden so in Auspuffhöhe mit Schadstoffen hoher Konzentration exponiert. Weitere chemische Umwandlungsprozesse haben noch nicht stattgefunden. Bodennahes Ozon ist deutlich messbar. In Bodennähe existiert ein anderes Mikroklima, als z.B. in 2 - 30 m Höhe, in der sich die Birkenkätzchen entwickeln. Generell setzen Gräserpollen mehr Protein frei als Baumpollen (Huss-Marp 2000). Dies war auch beim Vergleich der in der vorliegenden Studie untersuchten *Phleum*

*pratense*- und *Betula verrucosa*-Pollen der Fall. In mehreren Studien zeigte sich, dass der Einfluss der Umweltschadstoffe auf Pollen verschiedener Arten unterschiedlich ausgeprägt war (Huss-Marp 2000, Ruffin et al. 1986). Interessanterweise waren bei *Pinus*-Pollen, die in Deutschland keine allergisch relevante Bedeutung haben, vergleichsweise geringe Konzentrationen an PALM<sub>LTB4</sub> nachzuweisen. Klinisch relevante Pollenarten, wie Birke, Beifuß und Hasel dagegen wiesen hohe Mengen an PALMs, insbesondere Leukotrien-ähnliche Substanzen, auf (Behrendt et al. 1999). Bis jetzt ist jedoch nicht geklärt, welche genaue Funktion die PALMs in den Pollen erfüllen.

#### 5.4 Rolle von Lipoxygenasen und 14-3-3 Protein in Pollen

Pollen besitzen proinflammatorisch und immunmodulatorisch wirkende Leukotrien-ähnliche und Prostaglandin-ähnliche Substanzen (Traidl-Hoffmann et al. 2002, 2005, Plötz et al. 2004). Diese Substanzen werden unter dem Begriff Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs) zusammengefasst und konnten mittels HPLC unter anderem als Hydroxyoktatriensäure (HOTE), Hydroxyoktadiensäure (HODE) und Phytprostane identifiziert werden (Traidl-Hoffmann et al. 2002, 2005, Plötz et al. 2004). Diese PALMs entstehen autooxidativ oder enzymatisch und sind Produkte aus der Linol- und Linolensäure, im Gegensatz zu den Struktur-ähnlichen Substanzen in Säugetierzellen, den Leukotrienen und Prostaglandinen, die aus Arachidonsäure hervorgehen, welche aber in höheren Pflanzen nicht vorhanden ist. Es stellte sich somit die Frage, ob in Pollen das Enzym Lipoxygenase vorhanden ist, das diesen Lipidstoffwechsel einleitet, aus dem die PALMs hervorgehen. Der Nachweis der Lipoxygenase erfolgte bei den klinisch relevanten *Betula*- und *Phleum*-Pollen im Westernblot mittels eines Gurken-Lipoxygenase-Antikörpers. In *Phleum pratense*-Pollen wurde eine Proteinbande bei 96 kDa gefunden. Dies entspricht der Größe des Enzyms Lipoxygenase. Bei *Betula verrucosa*-Pollen konnte nur ein Lipoxygenase-Spaltprodukt von 66 kDa detektiert werden. Auch bei Gerste konnte von van Aarle et al. (1991) dieses Spaltprodukt gefunden werden. Als Erklärung hierfür werden in diesem Zusammenhang Lagerungsbedingungen der Pollen oder zu geringe Proteinkonzentrationen diskutiert. Auch bei dem Kontrollproteinextrakt der Gurke, wogegen der Antikörper spezifisch reagieren sollte, war dieses Spaltprodukt

sichtbar. Kasche (2002) konnte zudem mit einer anderen Extraktionsmethode auf Chloroform basierend bereits ein vollständiges 96 kDa großes Lipoxygenase-Produkt in *Betula*-Pollen nachweisen. Somit kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass *Betula*- und *Phleum*-Pollen Lipoxygenasen besitzen.

Holtman et. al. (2000 a, b) untersuchten zum erstenmal, ob das 14-3-3 Protein von Gerste mit Lipoxygenasen interagieren könnte. Dies ist besonders interessant, da Lipoxygenasen Schlüsselenzyme für den Lipidstoffwechsel sind und unter anderem bei der Stressregulierung eine Rolle spielen können (Holtman 2000 b). Es zeigte sich, dass Gerste Lipoxygenase 2 mit dem 14-3-3 Protein interagiert. Aktivierte Lipoxygenase 2, ein Regulatorprotein im Lipidstoffwechsel, führt zur vermehrten Bildung von 13-Hydroperoxid-Derivaten. Pflanzliche 13-Lipoxygenasen sind nicht nur an der Keimung von Pflanzen beteiligt, sondern auch an der Stress- und Pathogenabwehr (Holtman et al. 2000 b). Es wird vermutet, dass die Bindung von 14-3-3 Proteinen an ihre Zielproteine die genannten Vorgänge reguliert. Diese Proteine werden in zahlreichen Pflanzen durch äußere Stimulantien, wie z.B. Kältestress (Jarillo et al. 1994, Chelysheva et al. 1999), Pathogenbefall (Roberts und Bowles 1999, Brandt et al. 1992, Yan et al. 2002, Finnie et al. 2002), Hypoxie (de Vetten et al. 1995), Trockenheit (Yan et al. 2004), hohe Salzkonzentrationen (Chen et al. 1994) und osmotischen Stress (Shanko et al. 2003) beeinflusst. Die Funktion dieser ubiquitär vorkommenden Proteinfamilie wird bei Pollen hauptsächlich in der Regulierung der Pollenentwicklung gesehen (Pertl et al. 2001). Da dieses Protein jedoch, wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, in den vier Stadtbirken höher exprimiert war, als in den vier Landbirken, scheint es auch eine Rolle als Regulator bei der Stress-Abwehr bezüglich Verkehrsbelastung zu besitzen.

## **5.5 Einfluss der Pollen auf die menschliche Gesundheit**

### *Pollen besitzen proinflammatorisch- und immunmodulatorisch- wirkende Substanzen*

Die chemotaktische Wirkung der Pollen auf humane neutrophile Granulozyten konnte in der vorliegenden Studie nicht signifikant mit dem Gehalt an PALMs korreliert werden. Dies wäre aber ursprünglich zu erwarten gewesen, da HOTE

und HODE, die nachweislich in wässrigen Pollenextrakten enthalten sind zu den PALMs mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Leuktrien B<sub>4</sub>, dem stärksten Chemoattraktanz für Granulozyten, gehören. Das Potential der Pollenextrakte Granulozyten zur Migration anzuregen geht verloren, wenn der Rezeptor für LTB<sub>4</sub> blockiert wird (Traidl-Hoffmann et al. 2002). Der Gehalt an PALMs kann aktuell nur durch eine Kreuzreaktivität mit, eigentlich für humane und tierische Zellen ausgelegten ELISAs zur Bestimmung von LTB<sub>4</sub> und PGE<sub>2</sub>, analysiert werden. Demnach können unspezifische Bindungen im ELISA durch Verwendung von Pollenextrakt nicht ganz ausgeschlossen werden. Vorzustellen wäre, dass eventuell mehrere Polleninhaltsstoffe ähnlicher Struktur im ELISA kreuzreagieren von denen einige geringere Effekte z.B. schlechtere Bindung an den LTB<sub>4</sub>-Rezeptor auf humane neutrophile Granulozyten auslösen, bzw. umgekehrt. Dieses nicht uniforme PALMs-Gemisch kann eventuell das Fehlen der eigentlich erwarteten Korrelation der PALMs mit der chemotaktischen Wirkung der Pollenextrakte auf humane neutrophile Granulozyten erklären.

Besonders interessant unter dem umweltmedizinischen Aspekt ist der Befund, dass „Landpollen“-Extrakte eine signifikant niedrigere Stimulation von neutrophilen Granulozyten als „Stadtpollen“-Extrakte bewirkten. Denkbar wäre, dass Pollen ähnlich wie Säugetierzellen aufgrund von Stimulation hier Stress, vermehrt chemotaktisch wirksame Substanzen freisetzen. Stadtpollen setzen demnach vermehrt diese Substanzen im Gegensatz zu Landpollen frei. Die chemotaktische Wirkung der Pollensubstanzen ist nicht alleine beschränkt auf neutrophile Granulozyten von Allergikern, sondern auch neutrophile Granulozyten von Nicht-Atopikern konnten durch Pollenextrakte stimuliert werden (Traidl-Hoffmann et al. 2002). Demnach ist das Potential von Pollen auf das Immunsystem einzuwirken bis jetzt unterschätzt worden. Vielmehr wird deutlich, dass Pollen Substanzen freisetzen, die modulierend und aktivierend auf dendritische Zellen, die wichtigsten APZ, einwirken können, was dazu führt, dass *in vitro* eine vermehrte T<sub>H2</sub>-Antwort ablaufen kann (Traidl-Hoffmann et. al. 2005), was typisch einer allergischen Entzündung vom Typ I ist.

Die freigesetzten Polleninhaltsstoffe wirken in Kombination auf die menschliche Schleimhaut. Es kommt die Vermutung auf, dass PALMs aufgrund ihrer proinflammatorischen und immunmodulierenden Eigenschaften eine Rolle bei der

Sensibilisierung spielen könnten. Der höchste Gehalt an PALM<sub>LTB4</sub>, das eine starke proinflammatorische Wirkung besitzt, wurde in Gräserpollen gefunden. Dies könnte eventuell mit der relativ hohen Sensibilisierungsrate bei Kindern zusammenhängen. Die Bedeutung von Antioxidantien würde dementsprechend als Gegenspieler zu den adjuvant wirkenden Faktoren stehen. Auch hier fallen die Gräserpollen-Extrakte mit kaum nachweisbarer antioxidativer Aktivität auf. Der fehlende protektive dafür aber stark proinflammatorische Charakter von Gräserpollen-Extrakten könnte eventuell erklären, dass besonders viele Kinder bereits vor dem fünften Lebensjahr nachweislich gegen Graspollen sensibilisiert wurden.

#### Pollenextrakte wirken antioxidativ

In Kooperation mit Bors et al. (GSF-Institut für Strahlenbiologie, Neuherberg) wurden antioxidative Eigenschaften von wässrigen Pollenextrakten mittels DPPH Test untersucht. Dabei zeigte der Test zwar keine Unterschiede im antioxidativen Potential von *in vitro* im Wirbelschichtreaktor mit Schwefeldioxid bzw. Partikel exponierten Pollen im Vergleich zu den jeweiligen mit synthetischer Luft exponierten Kontrollen, wohl aber deutliche Artunterschiede. Eine Korrelation zur allergenen Potenz der Pollen bestand jedoch nicht. So zeigten sowohl Kieferpollen, eine nicht allergene Pollenart, aber auch Graspollen, eine klinisch relevante Art, kaum messbare antioxidative Eigenschaften. Die Freisetzung von Antioxidantien mit protektiver Wirkung gegenüber oxidativen Schädigungen von Zellen zeigte, dass Pollenextrakte nicht nur gesundheitlich negativ assoziierte Substanzen, wie die PALMs enthalten. Mehrere antioxidativ wirkende Substanzen wie Zimtsäure und Kampferole sind in Pollen nachgewiesen worden (Campos et al. 1997). Die Radikalfängereigenschaften der hier untersuchten Pollenextrakte (Erle, Birke, Wiesenlieschgras, Beifuß, Kiefer) scheinen auf der Substanz Quercetin zu beruhen. Der Gehalt an Quercetin in den Pollenextrakten wurde von Dr. Heller (Institut für biochemische Pflanzen-Pathologie, GSF, Neuherberg) bestimmt.

Bei vorangegangenen Studien zum Thema Einfluss von Umweltschadstoffen auf Pollen stellte sich heraus, dass vermutlich die Allergene nicht allein für die Zunahme von allergischen Erkrankungen verantwortlich gemacht werden können (Behrendt et al. 2001). Deswegen stand in dieser Arbeit der Pollen als Ganzes nicht nur beschränkt auf die Allergenebene, im Vordergrund. Aus gesundheitlichen Aspekten sind die zum erstenmal 1997 beschriebenen proinflammatorisch und immunmodulatorisch wirkenden Leukotrien-ähnlichen und Prostaglandin-ähnlichen Substanzen in Pollen, relevant (Behrendt et al. 1997, Traidl-Hoffmann et al. 2002, 2005, Plötz et al. 2004). Diese Substanzen werden unter dem Begriff Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs) zusammengefasst. Die Untersuchung von anthropogenen Einflussfaktoren auf sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Pollen in dieser Arbeit zeigten zum Teil deutliche Modifikationen der Pollen. Auch in anderen Studien mit zahlreichen Pollenarten (Behrendt et al. 1997, 1999, 2001, Thomas et al. 1997, Armentia et al. 2002, Majd et al. 2004, Cortegano et al. 2004) konnte der Einfluss von Schadstoffen auf Pollen gezeigt werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Befunde belegen den direkten Einfluss von anthropogenen Substanzen auf Pollen, was zu einer stärkeren entzündungsfördernden Wirkung von Polleninhaltsstoffen auf den menschlichen Organismus führen könnte. Dies unterstützt die Ergebnisse der epidemiologischen Studien, die den Anstieg der Umweltbelastung mit einer Prävalenz- Erhöhung von allergischen Erkrankungen assoziieren (Krämer et al. 2000, Wyler et al. 2000, Janssen et al. 2003, Shima et al. 2003, Sekine et al. 2004).

## 6 Zusammenfassung

Die wichtigsten Allergenträger der Außenluft sind Pollen von windbestäubenden Pflanzen. Sie sind medizinisch relevant, da sie zu den häufigsten Auslösern von allergischen Entzündungsreaktionen gehören. Besonders dramatisch hinsichtlich ihrer gesundheitlichen Bedeutung ist, dass die Häufigkeit von allergischen Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten weltweit zugenommen haben. Als eine wesentliche Ursache hierfür wird die zunehmende Umweltbelastung diskutiert, wobei hierbei meist der Effekt von Umweltschadstoffen auf den menschlichen Organismus berücksichtigt wurde. Ziel dieser Doktorarbeit war es hingegen, den Zusammenhang von Umweltbelastung und dem Anstieg von Allergien auf der Ebene der Allergenträger zu analysieren. Als These wird angenommen, dass Pollen durch Stress, ausgelöst durch Umweltbelastung, ihre Eigenschaften verändern und es dadurch zur Beeinflussung ihrer Allergenität und damit zu negativen Effekten auf die menschliche Gesundheit kommen könnte.

Dazu wurden Pollen nach unterschiedlicher Exposition charakterisiert. Die Analysen umfassten zunächst molekularbiologische Untersuchungen des Allergenträgers selbst, gefolgt von Effektstudien auf das humane Immunsystem. Nicht nur Allergene, als Hauptauslöser der allergischen Reaktion beschriebene Proteine, sondern auch Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs) sind relevant. Die PALMs zeigen in Funktionsassays einen Einfluss auf die Aktivierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Bei den untersuchten PALMs handelt es sich zum einen um Leukotrien-ähnliche Substanzen ( $\text{PALM}_{\text{LTB}_4}$ ) und zum anderen um Prostaglandin-ähnliche Substanzen ( $\text{PALM}_{\text{PGE}_2}$ ), deren Gehalt in Pollen durch Kreuzreaktivität mit Leukotrien  $\text{B}_4$ - und Prostaglandin  $\text{E}_2$ -ELISAs aus wässrigen Extrakten bestimmt wurden. Als Untersuchungsmaterial wurden Birkenpollen (*Betula verrucosa*) und Wiesenlieschgraspollen (*Phleum pratense*) verwendet. Für mehrere *in vitro* Expositionen mit Schwefeldioxid, Partikel und flüchtigen organischen Substanzen (VOCs) wurden kommerziell erworbene Pollen aus Schweden für die Vergleichsanalysen verwendet. Weiterhin wurden eigens frisch gesammelte Birkenpollen aus München eingesetzt. Dazu wurden die Birken gezielt aufgrund ihrer Verkehrslage ausgewählt. Die Umweltbelastung wurde entweder durch Messstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU) oder

durch Messung von Stickstoffdioxid am Standort mittels Passivsammler vorgenommen.

Es zeigte sich, dass die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch wässrige Pollenextrakte pollenkonzentrationsabhängig war. Zudem stellte sich heraus, dass verschieden *in vivo* exponierte Pollen unterschiedlich stark als Chemoattraktanz auf die neutrophilen Granulozyten wirkten. Eine Korrelation zu den PALMs im Pollenextrakt bestand nicht. Jedoch waren innerhalb einer Pollenart, aber auch zwischen Birken- und Graspollen, Gehaltsunterschiede, sowohl der PALM<sub>LTB4</sub> als auch der PALM<sub>PGE2</sub>, nachweisbar.

Zum erstenmal wurden allergene Pollen mittels 2D elektrophoretischer Auftrennung auf Proteinexpressionsunterschiede analysiert. In dieser Proteom-Studie wurden Pollen von vier Stadtbirken mit vier Pollenproben von Landbirken quantitativ verglichen. Die Auswertung erfolgte mittels der sensitiven „Difference Gelelektrophorese“ (DIGE) Technologie. 34 Proteine zeigten signifikante Expressionsunterschiede auf einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . Da das Birkengenom nicht bekannt ist, wurden acht regulierte und quantitativ hoch exprimierte Proteine mittels ESI-MS/MS *de novo* sequenziert und hinsichtlich Proteinsequenzhomologien verglichen. Von diesen Proteinen konnten Peptidsequenzen bestimmt werden. Ein Protein wurde als 14-3-3 Protein identifiziert. Dieses Protein ist an der Regulation von mehreren Signaltransduktionswegen beteiligt. In den Stadtbirkenpollen war dieses Protein höher exprimiert als in den Landbirkenpollen. Dies ist besonders interessant, da dieses Protein mit dem Enzym Lipoxygenase interagiert. Lipoxygenase ist an dem Lipidstoffwechselweg beteiligt, aus dem auch die PALMs hervorgehen. Dieser Stoffwechselweg ist nach dem Einwirken von biotischen und abiotischen Stressfaktoren auf Pflanzen vermehrt aktiv. Das Enzym Lipoxygenase ist auch in Pollen vorhanden. Erstmals konnte Lipoxygenase bei *Phleum pratense*-Pollen mittels Westernblot nachgewiesen werden. Ein mögliches Spaltprodukt dieses Enzyms von 66 kDa konnte auch bei *Betula verrucosa*-Pollen mit dieser Methode detektiert werden.

Neben der Proteom-Analyse wurde als weiteres Screening-Verfahren, um unterschiedlich exponierte Birkenpollen zu vergleichen, ein von Durner et al. (GSF) ursprünglich für *Arabidopsis*-Stressgene entwickelter Microarray eingesetzt. Vorab wurde die RNA-Isolierung aus Pollen evaluiert. Um ausreichende Mengen

an RNA sowie der entsprechenden Qualität der im Microarray eingesetzten cDNA zu gewährleisten, wurden zuvor die cDNA-Herstellung sowie eine PCR zur Kontrolle des Hauptallergens der Birke Bet v 1 und des Referenzgens 18 S rRNA erfolgreich etabliert. Es wurden 76 Gene identifiziert, die an Stressregulationen beteiligt sind.

In Kooperation mit Dr. Bors et al. (GSF-Institut für Strahlenbiologie, Neuherberg) wurden antioxidative Eigenschaften von wässrigen Pollenextrakten mittels DPPH-Test untersucht. In diesem Test wurde die Radikalfängerpotenz von Pollenextrakten bestimmt. Es konnten deutliche Artunterschiede gefunden werden. Haselpollen-Extrakte hatten das höchste antioxidativ wirkende Potential, gefolgt von Erlen-, Birken-, Beifuss-, Gras- und Kiefer-Pollenextrakten. Eine Korrelation zur allergenen Potenz der Pollen bestand jedoch nicht. So zeigten sowohl Kieferpollen, eine nicht allergene Pollenart, aber auch Graspollen, eine klinisch relevante Art, kaum messbare antioxidative Eigenschaften. Es stellte sich heraus, dass es keine Unterschiede im antioxidativen Potential gab, weder bei den mit Schwefeldioxid exponierten Birkenpollen noch bei den mit Partikel exponierten Gras- oder Birkenpollen im Vergleich zu den mit synthetischer Luft exponierten Kontrollen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Pollen auf Umweltstress mit Änderungen in ihrer Proteinexpression reagieren können. Äußere Umweltbedingungen hatten einen Einfluss auf die Charakteristika der Pollen. Zudem ist aus umweltmedizinischer Sicht zu beachten, dass Pollen-Extrakte von Stadtbirken *in vitro* eine deutlich stärkere chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten ausübten als Pollenextrakte hergestellt aus Landpollen *in vitro*. Dies sind erste Hinweise darauf, dass Birkenpollen ihre molekularbiologischen und zellbiologischen Eigenschaften aufgrund ihrer Expositionslage verändern und dies einen negativen Effekt auf die menschliche Gesundheit haben könnte.

## 7 Literatur

van Aarle PG, de Barse MM, Veldink GA, Vliegthart JF (1991): Purification of a lipoxygenase from ungerminated barley. Characterization and product formation. FEBS Lett. Mar 11;280(1):159-62

Aberg N (1989): Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. Clin Exp Allergy. Jan;19(1):59-63

Aberg N, Hesselmar B, Aberg B, Eriksson B (1995): Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. Clin Exp Allergy. Sep;25(9):815-9

Ahlholm JU, Helander ML, Savolainen J (1998): Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hamet-ahti) pollen. Clin Exp Allergy. Nov;28(11):1384-8

Aitken A (2002): Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. Plant Mol Biol. Dec;50(6):993-1010

Albright JF, Goldstein RA (1996): Airborne pollutants and the immune system. Otolaryngol Head Neck Surg. Feb;114(2):232-8

D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M (2002 a): Respiratory allergic diseases induced by outdoor air pollution in urban areas. Monaldi Arch Chest Dis. Jun-Aug;57(3-4):161-3

D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M (2002 b): Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. Eur Respir J. Sep;20(3):763-76

Armentia A, Lombardero M, Callejo A, Barber D, Martin Gil FJ, Martin-Santos JM, Vega JM, Arranz ML (2002): Is *Lolium* pollen from an urban environment more allergenic than rural pollen? Allergol Immunopathol (Madr). Jul-Aug;30(4):218-24

Bach JF (2002): The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. N Engl J Med. Sep 19;347(12):911-20

Bascom R, Naclerio RM, Fitzgerald TK, Kagey-Sobotka A, Proud D (1990): Effect of ozone inhalation on the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. Am Rev Respir Dis. Sep;142(3):594-601

Bedinger P (1992): The remarkable biology of pollen. Plant Cell. Aug;4(8):879-87

Begon M, Harper JL, Townsend CR (1999): Ecology, 3. Auflage, Verlag Blackwell Science, Oxford UK

- Behbehani N, Arifhodzic N, Al-Mousawi M, Marafie S, Ashkanani L, Moussa M, Al-Duwaisan A (2004): The seasonal variation in allergic rhinitis and its correlation with outdoor allergens in Kuwait. *Int Arch Allergy Immunol.* Feb;133(2):164-7
- Behrendt H, Friedrichs KH, Kainka-Stänicke, Darsow U, Becker MW, Tomingras R (1991): Allergens and pollutants in the air – a complex interaction. *New Trends in Allergy III.* Springer Verlag, Heidelberg
- Behrendt H, Becker MW, Friedrich KH, Darsow U, Tomingras R (1992): Interaction between aeroallergens and airborne particulate matters. *Int Arch Allergy Immunol.* 99:425-428
- Behrendt H, Friedrichs KH, Krämer U, Hitzfeld B, Becker WM, Ring J (1995): The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases. *Prog Allergy Clin Immunol* 3:83-89
- Behrendt H, Becker WM, Fritzsche C, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Friedrichs KH, Ring J (1997): Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int Arch Allergy Immunol.* May-Jul;113(1-3):69-74
- Behrendt H, Tomczok J, Sliwa-Tomczok W, Kasche A, Ebner von Eschenbach C, Becker WM, Ring J (1999): Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *Int Arch Allergy Immunol.* Feb-Apr;118(2-4):414-8
- Behrendt H, Kasche A, Ebner von Eschenbach C, Risse U, Huss-Marp J, Ring J (2001): Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *Int Arch Allergy Immunol.* Jan-Mar;124(1-3):121-5
- Behrendt H, Krämer U, Schäfer T, Kasche A, Eberlein-König B, Darsow U, Ring J (2001a): Allergotoxicology – environmental pollutants in allergy. *Allergy Clin Immunol International.* 13(3)122-128
- Behrendt H, Becker WM (2001): Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Curr Opin Immunol.* 2001 Dec;13(6):709-15
- Bellani LM, Rinallo C, Muccifora S, Gori P (1997): Effects of simulated acid rain on pollen physiology and ultrastructure in the apple. *Environ Pollut.* 95(3):357-62
- van den Bergh G, Clerens S, Vandesinde F, Arckens L (2003): Reversed-phase high-performance liquid chromatography prefractionation prior to two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identifies new differentially expressed proteins between striate cortex of kitten and adult cat. *Electrophoresis.* May;24(9):1471-81

Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein J, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB (2004): Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* Nov;114(5):1116-23

Black P (2001): Why is the prevalence of allergy and autoimmunity increasing? *Trends Immunol.* Jul;22(7):354-5

Blackley CH (1873): Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay-fever or hay-asthma). London: Baillière, Tindall und Cox

Blum H (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* 8:93-99

de Boer AH (2002) : Plant 14-3-3 proteins assist ion channels and pumps. *Biochem Soc Trans.* Aug;30(4):416-21

Bostock J (1819): Case of a periodical affection of the eyes and chest. *Med Chir. Trans.* 10:161-165

Bradford MM (1997): Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254

Brandt J, Thordal-Christensen H, Vad K, Gregersen PL, Collinge DB (1992): A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator. *Plant J.* Sep;2(5):815-20

Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E (2002): Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N Engl J Med.* Sep 19;347(12):869-77

Braun-Fahrlander C (2003): Environmental exposure to endotoxin and other microbial products and the decreased risk of childhood atopy: evaluating developments since April. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* Oct;3(5):325-9

Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbach M (1989): The gene coding for the major birch pollen allergen Bet v 1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* Jul;8(7):1935-8

Brunekreef B, Janssen NA, de Hartog J, Harssema H, Knape M, van Vliet P. Air pollution from truck traffic and lung function in children living near motorways. *Epidemiology.* 1997 May;8(3):298-303

Brunekreef B, Hoek G, Fischer P, Spijksma FT (2000): Relation between airborne pollen concentrations and daily cardiovascular and respiratory-disease mortality. *Lancet.* Apr 29;355(9214):1517-8

- Bufe A, Schramm G, Keown MB, Schlaak M, Becker WM (1995): Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase. *FEBS Lett.* Apr 17;363(1-2):6-12
- Bufe A, Betzel C, Schramm G, Petersen A, Becker WM, Schlaak M, Perbandt M, Dauter Z, Weber W (1996): Crystallization and preliminary diffraction data of a major pollen allergen. Crystal growth separates a low molecular weight form with elevated biological activity. *J Biol Chem.* Nov 1;271(44):27193-6
- Bufe A (1998): The biological function of allergens: relevant for the induction of allergic diseases? *Int Arch Allergy Immunol.* Dec;117(4):215-9
- Cadot P, Lejoly M, Van Hoeyveld EM, Stevens EA (1995): Influence of the pH of the extraction medium on the composition of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts. *Allergy.* May;50(5):431-7
- Campos M, Markham KR, Mitchell K, da Cunha PA (1997): An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochemical analysis.* 8:181-185
- Carnés J, Fernandez-Caldas E, Boluda L, Casanovas M, Sastre J, Lluch Bernal M, Blanca M (2002): Rapid release of Ole e 1 from olive pollen using different solvents. *Allergy.* Sep;57(9):798-804
- Chehregani A, Majde A, Moin M, Gholami M, Ali Shariatzadeh M, Nassiri H (2004): Increasing allergy potency of Zinnia pollen grains in polluted areas. *Ecotoxicol Environ Saf.* Jun;58(2):267-72
- Chelysheva VV, Smolenskaya IN, Trofimova MC, Babakov AV, Muromtsev GS (1999): Role of the 14-3-3 proteins in the regulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity in the plasma membrane of suspension-cultured sugar beet cells under cold stress. *FEBS Lett.* Jul 30;456(1):22-6
- Chen Z, Fu H, Liu D, Chang PF, Narasimhan M, Ferl R, Hasegawa PM, Bressan RA (1994): A NaCl-regulated plant gene encoding a brain protein homology that activates ADP ribosyltransferase and inhibits protein kinase C. *Plant J.* Nov;6(5):729-40
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK (2004): Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot.* Jan;55(395):225-36
- Coca AF, Cooke RA (1923): On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol.* 8: 163-182
- Cohn J, Sessa G, Martin GB (2001): Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol.* Feb;13(1):55-62
- Comparot S, Lingiah G, Martin T (2003): Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J Exp Bot.* Jan;54(382):595-604

McConn M, Browse J (1996): The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *Plant Cell*. Mar;8(3):403-416

Coombs RRA und Gell PGH (1963): The classification of allergic reactions underlying disease. In clinical aspects of immunology, Hrsg. Gell PGH und Coombs RRAH, S. 317, Davis, Philadelphia, USA

McCormick S (1993): Male Gametophyte Development. *Plant Cell*. Oct;5(10):1265-1275

McCormick S (2004): Control of male gametophyte development. *Plant Cell*. 16 Suppl:S142-53.

Cortegano I, Civantos E, Aceituno E, del Moral A, Lopez E, Lombardero M, del Pozo V, Lahoz C (2004): Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy*. May;59(5):485-90

Dahl R, Andersen PS, Chivato T, Valovirta E, de Monchy J (2004): National prevalence of respiratory allergic disorders. *Respir Med*. May;98(5):398-403

Delfino RJ, Becklake MR, Hanley JA (1994): The relationship of urgent hospital admissions for respiratory illnesses to photochemical air pollution levels in Montreal. *Environ Res*. Oct;67(1):1-19

Devalia JL, Rusznak C, Herdman MJ, Trigg CJ, Tarraf H, Davies RJ (1994): Effect of nitrogen dioxide and sulphur dioxide on airway response of mild asthmatic patients to allergen inhalation. *Lancet*. Dec 17;344(8938):1668-71

Diaz-Sanchez D (1997): The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy*. 52(38 Suppl):52-6; discussion 57-8

Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A (1997): Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol*. Mar 1;158(5):2406-13

Diaz-Sanchez D, Garcia MP, Wang M, Jyrjala M, Saxon A (1999): Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. Dec;104(6):1183-8

Duhme H, Weiland SK, Keil U, Kraemer B, Schmid M, Stender M, Chambless L (1996): The association between self-reported symptoms of asthma and allergic rhinitis and self-reported traffic density on street of residence in adolescents. *Epidemiology*. Nov;7(6):578-82

- Ealing PM, Casey R (1988): The complete amino acid sequence of a pea (*Pisum sativum*) seed lipoxygenase predicted from a near full-length cDNA. *Biochem J.* Aug 1;253(3):915-8
- Edwards J, Walters S, Griffiths RK (1994): Hospital admissions for asthma in preschool children: relationship to major roads in Birmingham, United Kingdom. *Arch Environ Health.* Jul-Aug;49(4):223-7
- Emberlin J, Savage M, Jones S (1993): Annual variations in grass pollen seasons in London 1961-1990: trends and forecast models. *Clin Exp Allergy.* Nov;23(11):911-8
- Emberlin J (1995): Interaction between air pollutants and aeroallergens. *Clin Exp Allergy.* Nov;25 Suppl 3:33-9
- Emberlin J, Detandt M, Gehrig R, Jaeger S, Nolard N, Rantio-Lehtimäki A (2002): Responses in the start of *Betula* (birch) pollen seasons to recent changes in spring temperatures across Europe. *Int J Biometeorol.* Sep;46(4):159-70.
- Ferl RJ (1996): 14-3-3 Proteins and signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Jun;47:49-73
- Ferl RJ (2004): 14-3-3 proteins: regulation of signal-induced events. *Physiol Plant.* Feb;120(2):173-178
- Ferreres F, Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F, Nieto JL, Rumbero A, Olías JM (1989): 8-Methoxykaempferol 3-sophoroside, a yellow pigment from almond pollen. *Phytochemistry.* 28(7):1901-1903
- Feussner I, Wasternack C, Kindl H, Kuhn H (1995): Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 5;92(25):11849-53.
- Feussner I, Balkenhohl TJ, Porzel A, Kuhn H, Wasternack C (1997): Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons. Implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J Biol Chem.* Aug 22;272(34):21635-41
- Feussner I, Kuhn H, Wasternack C (2001): Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* Jun;6(6):268-73
- Fiebig A, Mayfield JA, Miley NL, Chau S, Fischer RL, Preuss D (2000): Alterations in CER6, a gene identical to CUT1, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell.* Oct;12(10):2001-8
- Finkelman FD, Yang M, Orekhova T, Clyne E, Bernstein J, Whitekus M, Diaz-Sanchez D, Morris SC (2004): Diesel exhaust particles suppress in vivo IFN-gamma production by inhibiting cytokine effects on NK and NKT cells. *J Immunol.* Mar 15;172(6):3808-13

- Finnie C, Borch J, Collinge DB (1999): 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. *Plant Mol Biol.* Jul;40(4):545-54
- Finnie C, Andersen CH, Borch J, Gjetting S, Christensen AB, de Boer AH, Thordal-Christensen H, Collinge DB (2002): Do 14-3-3 proteins and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases interact in the barley epidermis in response to the barley powdery mildew fungus? *Plant Mol Biol.* May;49(2):137-47
- Fischer AM, Dubbs WE, Baker RA, Fuller MA, Stephenson LC, Grimes HD (1999): Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. *Plant J.* Sep;19(5):543-54
- Franze T, Weller MG, Niessner R, Pöschl U (2003): Enzyme immunoassays for the investigation of protein nitration by air pollutants. *Analyst.* Jul;128(7):824-31
- Franze T, Weller MG, Niessner R, Pöschl U (2004): Comparison of nitrotyrosine antibodies and development of immunoassays for the detection of nitrated proteins. *Analyst.* Jul;129(7):589-96
- Fritsche C, Becker WM, Behrendt H (1997): A method for investigating the effects of gaseous pollutants on pollen ultrastructure and allergen release in *New Trends in Allergy IV*, Springer Verlag, Heidelberg
- Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A (1998): Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces *In vivo* IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Sep;19(3):507-12
- Fujimaki H, Nohara O, Ichinose T, Watanabe N, Saito S (1994): IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology.* Sep 6;92(1-3):261-8
- Fujimaki H, Saneyoshi K, Nohara O, Shiraishi F, Imai T Intranasal instillation of diesel exhaust particulates and antigen in mice modulated cytokine productions in cervical lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995 Nov;108(3):268-73
- Fujimaki H, Saneyoshi K, Shiraishi F, Imai T, Endo T (1997): Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology.* Jan 15;116(1-3):227-33
- Fuller MA, Weichert H, Fischer AM, Feussner I, Grimes HD (2001): Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. *Arch Biochem Biophys.* Apr 1;388(1):146-54.
- Gilbert SF, Raunio AM (1997): *Embryology: Constructing the Organism.* Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Göbel C, Feussner I, Schmidt A, Scheel D, Sanchez-Serrano J, Hamberg M, Rosahl S (2001): Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Biol Chem.* Mar 2;276(9):6267-73

- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. Apr;21(6):1037-53
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004): Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. Dec;4(12):3665-85
- Grote M, Fromme HG (1986): Cross-reactivity of birch anthers and leaves with birch pollen antigens and allergens. A fine-structural immunocytochemical study using the post-embedding protein-A-gold technique. *J Histochem Cytochem*. Nov;34(11):1459-64
- Grote M, Vrtala S, Niederberger V, Valenta R, Reichelt R (2000): Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *J Allergy Clin Immunol*. Jun;105:1140-5
- Gubatz S, Herminghaus S, Meurer B, Strack D, Wiermann R (1986): The location of hydroxycinnamic acid amides in the exine of *corylus* pollen
- Hänninen AR, Mikkola JH, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Ylitalo L, Reunala T, Palosuo T (1999): Increased allergen production in turnip (*Brassica rapa*) by treatments activating defense mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*. Jul;104(1):194-201
- Heinrich J, Richter K, Magnussen H, Wichmann HE (1998): Is the prevalence of atopic diseases in East and West Germany already converging? *Eur J Epidemiol*. Apr;14(3):239-45
- Heinrich J, Hoelscher B, Frye C, Meyer I, Wjst M, Wichmann HE (2002): Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *Eur Respir J*. Jun;19(6):1040-6
- Helander ML, Savolainen J, Ahlholm J (1997): Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy*. Dec;52(12):1207-14
- Henry RL, Abramson R, Adler JA, Wlodarczyk J, Hensley MJ (1991): Asthma in the vicinity of power stations: I. A prevalence study. *Pediatr Pulmonol*. 11(2):127-33
- Hermann-Kunz E, Thierfelder W (2002): Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung, der Bundes-Gesundheitssurvey-Baustein der Gesundheitssurveillance in Deutschland, Robert Koch Institut, Berlin
- Hill R, Williams J, Tattersfield A, Britton J (1989): Change in use of asthma as a diagnostic label for wheezing illness in schoolchildren. *BMJ*. Oct 7;299(6704):898

Hitzfeld B, Friedrichs KH, Ring J, Behrendt H (1997): Airborne particulate matter modulates the production of reactive oxygen species in human polymorphonuclear granulocytes. *Toxicology*. Jul 11;120(3):185-95

Hjelmroos M, Schumacher MJ, Van Hage-Hamsten M (1995): Heterogeneity of pollen proteins within individual *Betula pendula* trees. *Int Arch Allergy Immunol*. Dec;108(4):368-76

Hoffmann-Sommergruber K (2002): Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans*. Nov;30(Pt 6):930-5

Holtman WL, Roberts MR, Oppedijk BJ, Testerink C, van Zeijl MJ, Wang M (2000 a): 14-3-3 proteins interact with a 13-lipoxygenase, but not with a 9-lipoxygenase. *FEBS Lett*. May 26;474(1):48-52

Holtman WL, Roberts MR, Wang M (2000 b): 14-3-3 proteins and a 13-lipoxygenase form associations in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem Soc Trans*. Dec;28(6):834-6

Holz O, Mucke M, Paasch K, Bohme S, Timm P, Richter K, Magnussen H, Jorres RA (2002): Repeated ozone exposures enhance bronchial allergen responses in subjects with rhinitis or asthma. *Clin Exp Allergy*. May;32(5):681-9

Huang X, von Rad U, Durner J (2002): Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells *Planta*. Oct;215(6):914-23

Huss-Marp (2000): Untersuchung zur Bedeutung der relativen Luftfeuchte für die Allergenfreisetzung aus Pollen, Dissertation, Technische Universität München  
Irnell L, Kiviloog J (1968): Bronchial asthma and chronic bronchitis in a Swedish urban and rural population. With special reference to prevalence, respiratory function and socio-medical condition. *Scand J Respir Dis Suppl*. 66:1-86

Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Yanagisawa R, Sagai M (1997): Murine strain differences in allergic airway inflammation and immunoglobulin production by a combination of antigen and diesel exhaust particles. *Toxicology*. Oct 19;122(3):183-92

ISAAC, the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (1998): Steering Committee Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*. Apr 25;351(9111):1225-32

Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E (1987): Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy*. Apr;58(4):265-70

Iwanami Y, Sasakuma T, Yamada Y (1988): Pollen: Illustrations and scanning electronmicrographs. Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg

Jackson M (2001): Allergy: the making of a modern plague. *Clin Exp Allergy*. Nov;31(11):1665-71

Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, Mueller MW (2003): Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy*. Oct;33(10):1443-9

Janeway C, Travers P, Walport M, Walport M, Shlomchik M (2002): *Immunologie*. 5.Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg

Janssen NA, Brunekreef B, van Vliet P, Aarts F, Meliefste K, Harssema H, Fischer P (2003): The relationship between air pollution from heavy traffic and allergic sensitization, bronchial hyperresponsiveness, and respiratory symptoms in Dutch schoolchildren. *Environ Health Perspect*. Sep;111(12):1512-8

Jarillo JA, Capel J, Leyva A, Martinez-Zapater JM, Salinas J (1994): Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Mol Biol*. Jul;25(4):693-704

Jörres R, Magnussen H (1990): Airways response of asthmatics after a 30 min exposure, at resting ventilation, to 0.25 ppm NO<sub>2</sub> or 0.5 ppm SO<sub>2</sub> *Eur Respir J*. Feb;3(2):132-7

Jörres R, Nowak D, Grimminger F, Seeger W, Oldigs M, Magnussen H (1995): The effect of 1 ppm nitrogen dioxide on bronchoalveolar lavage cells and inflammatory mediators in normal and asthmatic subjects. *Eur Respir J*. Mar;8(3):416-24

Jörres R, Nowak D, Magnussen H (1996): The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis. *Am J Respir Crit Care Med*. Jan;153(1):56-64

Kainka-Stänicke E, Behrendt H, Friedrichs KH, Tomingras R (1989): Mögliche Einflüsse von Luftverunreinigungen, Klima und Urbanität af allergische Rhinitis. *Allergologie*.13:67

Kaiser WM, Huber SC (2001): Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot*. Oct;52(363):1981-9

Kalsheker NA, Deam S, Chambers L, Sreedharan S, Brocklehurst K, Lomas DA (1996): The house dust mite allergen Der p1 catalytically inactivates alpha 1-antitrypsin by specific reactive centre loop cleavage: a mechanism that promotes airway inflammation and asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 5;221(1):59-61

Kappler R, Kristen U (1987): Photometric quantification of *in vitro* pollen tube growth: a new method suited to determine the cytotoxicity of various environmental substances. *Environmental and Experimental Botany*. 27(3):305-309

Kappos A, Bruckmann P, Eikmann T, Englert N, Heinrich U, Höppe P, Koch E, Metz N, Rauchfuss K, Rombout P, Schabronath J, Schulz-Klemp V, Spallek MF, Wichmann HE, Kreyling WG, Krause GHM (2003): Statusberichte: Bewertung des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes zur gesundheitlichen Wirkung von Partikeln in der Luft. *Umweltmed Forsch Prax* 8(5) 257-278

Kappos AD, Bruckmann P, Eikmann T, Englert N, Heinrich U, Hoppe P, Koch E, Krause GH, Kreyling WG, Rauchfuss K, Rombout P, Schulz-Klemp V, Thiel WR, Wichmann HE (2004): Health effects of particles in ambient air. *Int J Hyg Environ Health*. Sep;207(4):399-407

Kasche A, Klaus S, Thiel M, Buters J, Weichenmeier I, Krämer U, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C (2005): Release of LTB<sub>4</sub>-like pollen associated lipid mediators (PALM<sub>LTB4</sub>) from birch pollen in different air polluted areas in West and Southern Germany. *Journal of the World Allergy Congress, Supplement No.1 June26-July 1 2005 (Abstrakt)*

Kasche A (2002): Wechselwirkungen zwischen Birkenpollen und humanen polymorphnukleären Granulozyten von Atopikern und Normalpersonen: Bedeutung für die Initialphase der allergischen Entzündung, Dissertation, Technische Universität München

Keil U, Weiland SK, Duhme H, Chambless L (1996): The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): objectives and methods; results from German ISAAC centres concerning traffic density and wheezing and allergic rhinitis. *Toxicol Lett*. Aug;86(2-3):99-103

Kobayashi T, Ito T (1995): Diesel exhaust particulates induce nasal mucosal hyperresponsiveness to inhaled histamine aerosol. *Fundam Appl Toxicol*. Sep;27(2):195-202

Kobayashi T, Ikeue T, Ito T, Ikeda A, Murakami M, Kato A, Maejima K, Nakajima T, Suzuki T (1997): Short-term exposure to diesel exhaust induces nasal mucosal hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. *Fundam Appl Toxicol*. Aug;38(2):166-72

Knox RB, Suphioglu C (1996) : Pollen allergens: development and function. *Sex Plant Reprod*. 9:318-323

Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, Bursill LA (1997): Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy*. Mar;27(3):246-51

- Kohlmann M, Bachmann A, Weichert H, Kolbe A, Balkenhohl T, Wasternack C, Feussner I (1999): Formation of lipoxygenase-pathway-derived aldehydes in barley leaves upon methyl jasmonate treatment. *Eur J Biochem.* Mar;260(3):885-95
- Kozlov MV, Zvereva EL (2004): Reproduction of mountain birch along a strong pollution gradient near Monchegorsk, Northwestern Russia. *Environ Pollut.* Dec;132(3):443-51
- Krämer U, Behrendt H, Dolgner R, Ranft U, Ring J, Willer H, Schlipkoter HW (1999): Airway diseases and allergies in East and West German children during the first 5 years after reunification: time trends and the impact of sulphur dioxide and total suspended particles. *Int J Epidemiol.* Oct;28(5):865-73
- Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE (1999a): Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet.* Feb 6;353(9151):450-4
- Krämer U, Koch T, Ranft U, Ring J, Behrendt H (2000): Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology.* Jan;11(1):64-70
- Krämer U, Link E, Oppermann H, Ranft U, Schäfer T, Thriene B, Behrendt H, Ring J (2002): Studying school beginners in western and eastern Germany: allergy trends and sensitisations 1991-2000 *Gesundheitswesen.* Dec;64(12):657-63
- Krämer U, Lemmen CH, Behrendt H, Link E, Schäfer T, Gostomzyk J, Scherer G, Ring J (2004): The effect of environmental tobacco smoke on eczema and allergic sensitization in children. *Br J Dermatol.* Jan;150(1):111-8
- Kusunoki T, Korematsu S, Nakahata T, Hosoi S (2002): Cedar pollinosis in Japanese schoolchildren: results from a large questionnaire-based survey Arerugi. *Jan;51(1):15-9*
- Kyhse-Andersen J (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* Dec;10(3-4):203-9
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* Aug 15;227(259):680-5
- Larrick JW, Buckley CE 3rd, Machamer CE, Schlagel GD, Yost JA, Blessing-Moore J, Levy D (1983): Does hyperimmunoglobulinemia-E protect tropical populations from allergic disease? *J Allergy Clin Immunol.* Feb;71(2):184-8
- Leduc-Brodard V, David B, Peltre G (1994): Comparison of three horizontal two-dimensional electrophoretic techniques to separate grass pollen allergens. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* Feb;40(1):1-8

- Lemmen C, Schober W, Buters J, Behrendt H (2004): Dieselruß und Allergien. *Allergo Journal* 13:311-322
- LfU: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (2003): Jahresbericht 2003. Schriftenreihe Heft 174
- Linskens HF, van Megen Y, Pfahler PL, Wilcox M (1985): Sulfur dioxide effects on petunia pollen germination and seed set. *Bull Environ Contam Toxicol.* May;34(5):691-5
- Linskens HF, Jorde W (1997): Pollen as food and medicine - a review. *Economic Botany.* 51(1):78-87
- van Loon LC, van Strien EA (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85-97
- Lovik M, Hogseth AK, Gaarder PI, Hagemann R, Eide I (1997): Diesel exhaust particles and carbon black have adjuvant activity on the local lymph node response and systemic IgE production to ovalbumin. *Toxicology.* Aug 15;121(2):165-78
- Lush WM, Grieser F, Wolters-Arts M (1998): Directional guidance of nicotiana alata pollen tubes in vitro and on the stigma *Plant Physiol.* Nov;118(3):733-41
- Luttmann H, Gromping U, Kreienbrock L, Treiber-Klotzer C, Wolf-Ostermann K, Wichmann HE (1994): Cohort study of respiratory tract diseases and lung function in school children in southwest Germany. 2. Regional influences on respiratory tract diseases in Mannheim and the Freiburg area] *Zentralbl Hyg Umweltmed.* Aug;196(2):114-38
- Ma TH, Khan SH (1976): Pollen mitosis and pollen tube growth inhibition by SO<sub>2</sub> in cultured pollen tubes of *Tradescantia*. *Environ Res.* Oct;12(2):144-9
- Magnussen H, Jörres R, Wagner HM, von Nieding G (1990): Relationship between the airway response to inhaled sulfur dioxide, isocapnic hyperventilation, and histamine in asthmatic subjects. *Int Arch Occup Environ Health.* 62(7):485-91
- Majd A, Chehregani A, Moin M, Gholami M, Kohno S, Nabe T, Shariatzade MA (2004): The effects of air pollution on structures, proteins and allergenicity of pollen grains. *Aerobiologica.* 20:111-118
- Markovic-Housley Z, Degano M, Lamba D, von Roepenack-Lahaye E, Clemens S, Susani M, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder H (2003): Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol.* Jan 3;325(1):123-33
- Martinez FD (2001): The coming-of-age of the hygiene hypothesis. *Respir Res.* 2(3):129-32.

- Mascarenhas JP (1993): Molecular Mechanisms of Pollen Tube Growth and Differentiation. *Plant Cell*. Oct;5(10):1303-1314
- Masuda S, Takeuchi K, Yuta A, Okawa C, Ukai K, Sakakura Y (1998): Japanese cedar pollinosis in children in our allergy clinic Arerugi. *Nov*;47(11):1182-9
- Melén E, Wickman M, Nordvall SL, van Hage-Hamsten M, Lindfors A (2001): Influence of early and current environmental exposure factors on sensitization and outcome of asthma in pre-school children. *Allergy*. Jul;56(7):646-52
- Menzel A (2000): Trends in phenological phases in Europe between 1951 and 1996. *Int J Biometeorol*. Aug;44(2):76-81
- Meurer B, Wiermann R, Strack D (1988): Phenylpropanoid patterns in fagales pollen and their phylogenetic relevance. *Phytochemistry*. 27(3):823-828
- Midoro-Horiuti T, Brooks EG, Goldblum RM (2001): Pathogenesis-related proteins of plants as allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol*. Oct;87(4):261-71
- Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim HB, Sagai M (1998): Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol*. Nov;102(5):805-12
- Mogensen JE, Wimmer R, Larsen JN, Spangfort MD, Otzen DE (2002): The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J Biol Chem*. Jun 28;277(26):23684-92
- Molfino NA, Wright SC, Katz I, Tarlo S, Silverman F, McClean PA, Szalai JP, Raizenne M, Slutsky AS, Zamel N (1991): Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects. *Lancet*. Jul 27;338(8761):199-203
- Molhave L (2003): Organic compounds as indicators of air pollution. *Indoor Air*. 13 Suppl 6:12-9
- Montnemery P, Bengtsson P, Elliot A, Lindholm LH, Nyberg P, Lofdahl CG (2001): Prevalence of obstructive lung diseases and respiratory symptoms in relation to living environment and socio-economic group. *Respir Med*. Sep;95(9):744-52
- Munzuroglu O, Obek E, Geckil H (2003): Effects of simulated acid rain on the pollen germination and pollen tube growth of apple (*Malus sylvestris* Miller cv. Golden). *Acta Biol Hung*. 54(1):95-103
- Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikemori R, Tokiwa H (1986): Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol*. Apr;77(4):616-23

Murfett J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure BA (1996): S RNase and Interspecific Pollen Rejection in the Genus *Nicotiana*: Multiple Pollen-Rejection Pathways Contribute to Unilateral Incompatibility between Self-Incompatible and Self-Compatible Species. *Plant Cell*. Jun;8(6):943-958

Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2001): Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*. 75:237-240

Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2002): Scavenging capacities of pollen extracts from *cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. *Nutrition Research*. 22:519-526

Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Myoda T, Nagashima T (2005): Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen *Cistus ladaniferus*. *Int J Mol Med*. Feb;15(2):259-63

Nicolai T, Bellach B, Mutius EV, Thefeld W, Hoffmeister H (1997): Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany. *Clin Exp Allergy*. Aug;27(8):886-92

Ninan TK, Russell G (1992): Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ*. Apr 4;304(6831):873-5

Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A (1998): Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol*. Oct;102(4 Pt 1):539-54

Neuhaus JM, Sticher L, Meins F Jr, Boller T (1991): A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 15;88(22):10362-6

Newson R, Strachan D, Archibald E, Emberlin J, Hardaker P, Collier C (1997): Effect of thunderstorms and airborne grass pollen on the incidence of acute asthma in England, 1990-94. *Thorax*. Aug;52(8):680-5

Nürnberg T, Scheel D (2001): Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*. Aug;6(8):372-9

Osterlee A, Drijver M, Lebet E, Brunekreef B (1996): Chronic respiratory symptoms in children and adults living along streets with high traffic density. *Occup Environ Med*. Apr;53(4):241-7

Palmes ED, Gunnison AF, DiMattio J, Tomczyk C (1976): Personal sampler for nitrogen dioxide. *Am Ind Hyg Assoc J*. Oct;37(10):570-7

Parton RM, Fischer-Parton S, Watahiki MK, Trewavas AJ (2001): Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes. *J Cell Sci*. Jul;114(Pt 14):2685-95

Pershagen G, Rylander E, Norberg S, Eriksson M, Nordvall SL (1995): Relation involving nitrogen dioxide exposure and wheezing bronchitis in children. *Int J Epidemiol.* Dec;24(6):1147-53

Pertl H, Himly M, Gehwolf R, Kriechbaumer R, Strasser D, Michalke W, Richter K, Ferreira F, Obermeyer G (2001): Molecular and physiological characterisation of a 14-3-3 protein from lily pollen grains regulating the activity of the plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase during pollen grain germination and tube growth. *Planta.* May;213(1):132-41

Piffanelli P, Ross JH, Murphy DJ (1997): Intra- and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *Plant J.* Mar;11(3):549-62

von Pirquet C (1906): *Allergy.* *Münch. Med. Wochensch* 30:1457-1458

Plötz SG, Traidl-Hoffmann C, Feussner I, Kasche A, Feser A, Ring J, Jakob T, Behrendt H (2004): Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators. *J Allergy Clin Immunol.* Jun;113(6):1152-60.

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD Lung (2002): cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* Mar 6;287(9):1132-41

Poupard P, Strullu DG, Simoneau P (1998): Two members of the Bet v 1 gene family encoding birch pathogenesis-related proteins display different patterns of root expression and wound-inducibility. *Ast J Plant Pysiol.* 25:459-464

Preuss D, Lemieux B, Yen G, Davis RW (1993) : A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* Jun;7(6):974-85

Pruitt RE, Vielle-Calzada JP, Ploense SE, Grossniklaus U, Lolle SJ (2000): FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* Feb 1;97(3):1311-6

Puc M (2003): Characterisation of pollen allergens. *Ann Agric Environ Med.* 10(2):143-9

Riedel F, Kramer M, Scheibenbogen C, Rieger CH (1988): Effects of SO<sub>2</sub> exposure on allergic sensitization in the guinea pig. *J Allergy Clin Immunol.* Oct;82(4):527-34

Riediker M, Monn C, Koller T, Stahel WA, Wüthrich B (2001): Air pollutants enhance rhinoconjunctivitis symptoms in pollen-allergic individuals. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Oct;87(4):311-8

- Riedl M, Diaz-Sanchez D (2005): Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol.* Feb;115(2):221-8; quiz 229
- Ring J, Eberlein-Koenig B, Behrendt H (2001): Environmental pollution and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Dec;87(6 Suppl 3):2-6
- Ring J, Behrendt H, Schäfer T, Vieluf D, Krämer U (1995): Impact of air pollution on allergic diseases: clinical and epidemiological studies. In *Progress Allergy Clin. Immunol.* 3:174-182
- Ring J, Krämer U, Schäfer T, Abeck D, Vieluf D, Behrendt H (1999): Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany. *Int Arch Allergy Immunol.* Feb-Apr;118(2-4):403-7
- Ring J, Krämer U, Schäfer T, Behrendt H (2001): Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol.* Dec;13(6):701-8
- Ring J (2003): *Angewandte Allergologie*, 3. Auflage, Urban und Vogel Medien und Medizin, München
- Ring J (2004): *Weißbuch der Allergie in Deutschland*, 2. Auflage, Urban und Vogel Medien und Medizin, München
- Risse U (2000): Wechselwirkungen von flüchtigen organisch-chemischen sowie partikulären Luftinhaltsstoffen mit Allergenträgern und Allergenen als Auslöser IgE-vermittelter Überempfindlichkeitsreaktionen, Habilitationsschrift, Technische Universität München
- Roberts MR, Bowles DJ (1999): Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol.* Apr;119(4):1243-50
- Roberts MR, Salinas J, Collinge DB (2002): 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant Mol Biol.* Dec;50(6):1031-9
- Roberts MR (2003): 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends Plant Sci.* May;8(5):218-23
- Roberts G, Hurley C, Bush A, Lack G (2004): Longitudinal study of grass pollen exposure, symptoms, and exhaled nitric oxide in childhood seasonal allergic asthma. *Thorax.* Sep;59(9):752-6
- Rodriguez-Garcia MI, M'rani-Alaoui M, Fernandez MC (2003): Behavior of storage lipids during development and germination of olive (*Olea europaea* L.) pollen. *Protoplasma.* Jun;221(3-4):237-44
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK (1995): *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Romagnani S (1994): Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol.* Dec;6(6):838-46

- Romagnani S (2004): The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology*. Jul;112(3):352-63
- Rosenquist M, Sehnke P, Ferl RJ, Sommarin M, Larsson C (2000): Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J Mol Evol*. Nov;51(5):446-58
- Ruffin J, Liu MY, Sessoms R, Banerjee S, Banerjee UC (1986): Effects of certain atmospheric pollutants (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> and CO) on the soluble amino acids, molecular weight and antigenicity of some airborne pollen grains. *Cytobios*. 986;46(185):119-29
- Rusznak C, Devalia JL, Davies RJ (1996): Airway response of asthmatic subjects to inhaled allergen after exposure to pollutants. *Thorax*. Nov;51(11):1105-8
- Sachverständigenrat für Umweltfragen (1999): Außenluft-Allergene. 230:114, Verlag Metzler-Poeschel, Stuttgart
- Sagai M, Furuyama A, Ichinose T Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(2):199-209
- Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN (1987): Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. Sep 4;237(4819):1171-6
- Schaffrath U, Mauch F, Freydl E, Schweizer P, Dudler R (2000): Constitutive expression of the defense-related *Rir1b* gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol Biol*. May;43(1):59-66
- Schäppi GF, Taylor PE, Staff IA, Rolland JM, Suphioglu C (1999 a): Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1. *Allergy*. May;54(5):478-83
- Schäppi GF, Taylor PE, Pain MC, Cameron PA, Dent AW, Staff IA, Suphioglu C (1999 b): Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens. *Clin Exp Allergy*. May;29(5):633-41
- Schupp A, Kaaden R, Islam MS, Kreienbrock L, Porstmann F, Rosenlehner R, Spix C, Stiller T, Wichmann HE (1994): Einfluss verkehrabhängiger Immissionen auf Empfindlichkeit der Atemwege bei Kindern in Duisburg. *Allergologie* 12:591-597
- Schwartz J, Slater D, Larson TV, Pierson WE, Koenig JQ (1993): Particulate air pollution and hospital emergency room visits for asthma in Seattle. *Am Rev Respir Dis*. Apr;147(4):826-31

Sehnke PC, DeLille JM, Ferl RJ (2002): Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell*;14 Suppl:S339-54

Shanko AV, Mesenko MM, Klychnikov OI, Nosov AV, Ivanov VB (2003): Proton pumping in growing part of maize root: its correlation with 14-3-3 protein content and changes in response to osmotic stress. *Biochemistry (Mosc)*. Dec;68(12):1320-6

Sekine K, Shima M, Nitta Y, Adachi M (2004): Long term effects of exposure to automobile exhaust on the pulmonary function of female adults in Tokyo, Japan. *Occup Environ Med* Apr;61(4):350-7

Shima M, Nitta Y, Adachi M (2003): Traffic-related air pollution and respiratory symptoms in children living along trunk roads in Chiba Prefecture, Japan. *J Epidemiol*. Mar;13(2):108-19

Siedow JN (1991): Plant lipoxygenase-structure and function. *Annu Rev Plant Physiol*. 42:145-188

Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Dosch IM, Becker WM, Behrendt H (2001): [Immunomicroscopic identification of major allergens in pollen of cat's tail grass (*Phleum pratense* L.)] *Pneumologie*. May;55(5):224-5

Solomon WR (2002): Airborne pollen: a brief life. *J Allergy Clin Immunol*. Jun;109(6):895-900

Stanley RG, Linskens HF (1985): *Pollen, Biologie, Biochemie, Gewinnung und Verbreitung*. Urs Verlag, Greifenberg

Stewart GA, McWilliam AS (2001): Endogenous function and biological significance of aeroallergens: an update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. Feb;1(1):95-103

Strachan DP, Taylor EM, Carpenter RG (1996): Family structure, neonatal infection, and hay fever in adolescence. *Arch Dis Child*. May;74(5):422-6  
Sturm JJ, Yeatts K, Loomis D (2004): Effects of tobacco smoke exposure on asthma prevalence and medical care use in North Carolina middle school children. *Am J Public Health*. Feb;94(2):308-13

Studnicka M, Hackl E, Pischinger J, Fangmeyer C, Haschke N, Kuhr J, Urbanek R, Neumann M, Frischer T (1997): Traffic-related NO<sub>2</sub> and the prevalence of asthma and respiratory symptoms in seven year olds. *Eur Respir J*. 1997 Oct;10(10):2275-8

Suzuki T, Kanoh T, Kanbayashi M, Todome Y, Ohkuni H (1993) The adjuvant activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice. *Aerugi*. Aug;42(8):963-8

Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Ohashi H, Muranaka M, Miyamoto T (1989): Enhancing effect of suspended particulate matter on the IgE antibody production in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 90(1):1-7

Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M (1997): Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* Jul;156(1):36-42

Taylor B, Wadsworth J, Wadsworth M, Peckham C (1984): Changes in the reported prevalence of childhood eczema since the 1939-45 war. *Lancet*, Dec 1;2(8414):1255-7

Taylor PE, Flagan RC, Valenta R, Glovsky MM (2002): Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* Jan;109(1):51-6

Taylor PE, Flagan R, Miguel AG, Valenta R, Glovsky MM (2003): Identification of birch pollen respirable particles. *Chest.* Mar;123(3 Suppl):433S

Thomas P, Strube D, Przybilla B (1997): Altered skin prick test reactivity and histamine release with extracts from pollen exposed to pollutants. *Int Arch Allergy Immunol.* May-Jul;113(1-3):264-5

Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M (2001): Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics.* Mar;1(3):377-96

Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Jakob T, Huger M, Plötz S, Feussner I, Ring J, Behrendt H (2002): Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J Allergy Clin Immunol.* May;109(5):831-8

Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Menzel A, Jakob T, Thiel M, Ring J, Behrendt H (2003): Impact of pollen on human health: more than allergen carriers? *Int Arch Allergy Immunol.* May;131(1):1-13

Traidl-Hoffmann C, Mariani V, Hochrein H, Karg K, Wagner H, Ring J, Mueller MJ, Jakob T, Behrendt H (2005): Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med.* Feb 21;201(4):627-36

Tunnicliffe WS, Burge PS, Ayres JG (1994): Effect of domestic concentrations of nitrogen dioxide on airway responses to inhaled allergen in asthmatic patients. *Lancet.* Dec 24-31;344(8939-8940):1733-6

Tunnicliffe WS, Evans DE, Mark D, Harrison RM, Ayres JG (2001): The effect of exposure to sulphuric acid on the early asthmatic response to inhaled grass pollen allergen. *Eur Respir J.* Oct;18(4):640-6

- Tunncliffe WS, Harrison RM, Kelly FJ, Dunster C, Ayres JG (2003): The effect of sulphurous air pollutant exposures on symptoms, lung function, exhaled nitric oxide, and nasal epithelial lining fluid antioxidant concentrations in normal and asthmatic adults. *Occup Environ Med.* Nov;60(11): 15
- Ünlü M (1999): Difference gel electrophoresis: *Biochem Soc Trans.* Aug;27(4):547-9
- Ussetti P, Roca J, Agusti AG, Montserrat JM, Rodriguez-Roisin R, Agusti-Vidal A (1984): Another asthma outbreak in Barcelona: role of oxides of nitrogen. *Lancet.* Jan 21;1(8369):156
- Venn A, Yemaneberhan H, Lewis S, Parry E, Britton J. Proximity of the home to roads and the risk of wheeze in an Ethiopian population. *Occup Environ Med.* 2005 Jun;62(6):376-80.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. (2001): The sequence of the human genome. *Science.* 2001 Feb 16;291(5507):1304-51
- de Vetten NC, Ferl RJ (1995): Characterization of a maize G-box binding factor that is induced by hypoxia. *Plant J.* Apr;7(4):589-601
- van Vliet P, Knape M, de Hartog J, Janssen N, Harssema H, Brunekreef B (1997): Motor vehicle exhaust and chronic respiratory symptoms in children living near freeways. *Environ Res.* 74(2):122-32
- Vinckier S, Smets E (2001): The potential role of orbicules as a vector of allergens. *Allergy.* Dec;56(12):1129-36
- Vollmert C (2002): Methoden und Geräteentwicklung zur in vitro Exposition humaner Keratinozyten aus atopischen Ekzemen gegenüber Schadstoffen in der Gasphase. Dissertation, Technische Universität München
- Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, Valent P, Reichelt R, Kraft D, Valenta R (1999): Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol.* Nov 15;163(10):5489-96
- Wasternack C, Hause B (2002): Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 72:165-221
- Weiland SK, von Mutius E, Hirsch T, Duhme H, Fritzsche C, Werner B, Husing A, Stender M, Renz H, Leupold W, Keil U (1999): Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J.* Oct;14(4):862-70
- Weinberg EG (2000): Urbanization and childhood asthma: an African perspective. *J Allergy Clin Immunol.* Feb;105(2 Pt 1):224-31

Weisel CP (2002): Assessing exposure to air toxics relative to asthma. *Environ Health Perspect.* Aug;110 Suppl 4:527-37

Whitekus MJ, Li N, Zhang M, Wang M, Horwitz MA, Nelson SK, Horwitz LD, Brechun N, Diaz-Sanchez D, Nel AE (2002): Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in a murine model for ovalbumin sensitization. *J Immunol.* Mar 1;168(5):2560-7

Wiermann R (1972): Synthesis of phenylpropane derivatives during pollen development. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* Feb;353(2):129

Wiermann R, Vieth K (1983): Outer pollen wall, an important accumulation site for flavonoids. *Protoplasma* 118:230-233

Wjst M, Reitmeir P, Dold S, Wulff A, Nicolai T, von Loeffelholz-Colberg EF, von Mutius E (1993): Road traffic and adverse effects on respiratory health in children. *BMJ.* 1993 Sep 4;307(6904):596-600

Wolters-Arts M, Lush WM, Mariani C (1998): Lipids are required for directional pollen-tube growth. *Nature.* Apr 23;392(6678):818-21

Wüthrich B. (1989): Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 90 Suppl 1:3-10

Wüthrich B, Schindler C, Leuenberger P, Ackermann-Liebrich U (1995): Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). *Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults.* *Int Arch Allergy Immunol.* Feb;106(2):149-56

Wyler C, Braun-Fahrländer C, Kunzli N, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Perruchoud AP, Leuenberger P, Wuthrich B (2000): Exposure to motor vehicle traffic and allergic sensitization. *The Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team.* *Epidemiology.* Jul;11(4):450-6

Yaffe MB (2002): How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* Feb 20;513(1):53-7

Yan J, Wang J, Zhang H (2002): An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism. *Plant J.* Jan;29(2):193-202

Yan J, He C, Wang J, Mao Z, Holaday SA, Allen RD, Zhang H (2004): Overexpression of the Arabidopsis 14-3-3 protein GF14 lambda in cotton leads to a "stay-green" phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. *Plant Cell Physiol.* Aug;45(8):1007-14

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R (2002): Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science.* Apr 19;296(5567):490-4

---

Yemaneberhan H, Flohr C, Lewis SA, Bekele Z, Parry E, Williams HC, Britton J, Venn A (2004): Prevalence and associated factors of atopic dermatitis symptoms in rural and urban Ethiopia. *Clin Exp Allergy*. May;34(5):779-85

Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y, Shimizu T (1997): A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*. Jun 5;387(6633):620-4

Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T (2001): Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. *Arch Biochem Biophys*. Jan 15;385(2):231-41

Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004): Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 2;101(44):15811-6

Zhang H, Wang J, Nickel U, Allen RD, Goodman HM (1997): Cloning and expression of an *Arabidopsis* gene encoding a putative peroxisomal ascorbate peroxidase. *Plant Mol Biol*. Aug;34(6):967-71

## **Appendix**

- I Erhebungsbogen
- II Baumphotos
- III Erhebungsbogen - Baum- und Standortcharakteristika
- IV Monatsmittelwerte der Umweltmessstationen des Landesamtes für  
Umweltschutz (LfU)
- V Polleninhaltsstoffe
- VI Migrationindizes
- VII Erklärung
- VIII Danksagung

## I Erhebungsbogen



## Erhebungsbogen Birkenpollen 2003

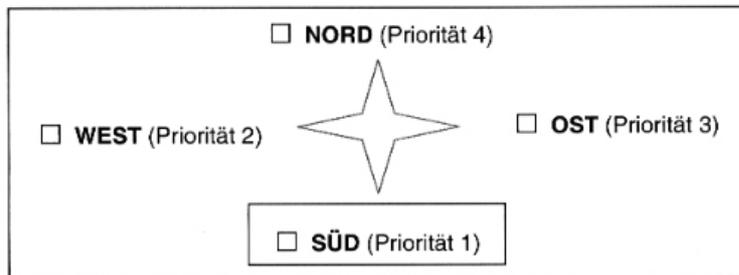


1	Stationsnr. : _____	Art der Station: _____
2	Ort : _____	Straße : _____
	Atlas-Seite : _____	
3	Gruppennummer der Probennehmer :	____
4	Datum der Probennahme :	____.____.2003
		Tag      Monat      Jahr
5	Uhrzeit der Probennahme :	____:____
		Stunde      Minute
6	Straßencharakteristik :	Nebenstraße mit Tempo 30-Limit <input type="checkbox"/> Nebenstraße ohne Tempo 30-Limit <input type="checkbox"/> Hauptstraße <input type="checkbox"/>
7	Verkehrslage : (Mehrfachnennungen sind möglich)	Anwohnerverkehr (in Wohngebieten) <input type="checkbox"/> Durchgangsverkehr <input type="checkbox"/> Berufsverkehr <input type="checkbox"/>
8	Entfernung vom Baum zur nächsten Straße	weniger als 10 m <input type="checkbox"/> 11 bis 20 m <input type="checkbox"/> mehr als 20 m <input type="checkbox"/>
9	Entfernung vom Baum zu einer verkehrsreichen Straße (Berufs-/Durchgangsverkehr)	bis zu 10 m <input type="checkbox"/> 11 bis 50 m <input type="checkbox"/> 51 bis 150 m <input type="checkbox"/> mehr als 150 m <input type="checkbox"/>
10	Befindet sich der Baum in einer Straßenschlucht von mindestens 100 Metern Länge ? (Mit Straßenschlucht ist gemeint: überwiegend geschlossene Häuserzeilen auf beiden Seiten der Straße. Querstrassen und, einzelne Hauseingänge und Hofeinfahrten sind erlaubt.) WENN „NEIN“, was trifft zu ?	ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Straßenschlucht von <u>weniger</u> als 100 Meter Länge <input type="checkbox"/> nur auf einer Straßenseite geschlossene Häuserzeile <input type="checkbox"/> mindestens an einer Seite freistehende Häuser mit Gärten <input type="checkbox"/> Verkehrsinsel <input type="checkbox"/> anderes <input type="checkbox"/>
11	Wetter	sonnig <input type="checkbox"/> überwiegend sonnig <input type="checkbox"/> bewölkt <input type="checkbox"/> regnerisch <input type="checkbox"/>
12	Temperatur	____ °C
13	relative Luftfeuchtigkeit	____ %

14 Birkenbestimmung

	<b><i>Betula pendula</i></b> (Hängebirke, Weißbirke, Warzenbirke, Sandbirke)	<b><i>Betula pubescens</i></b> (Moorbirke, Haarbirke, Besenbirke)
<u>Habitus</u>	<input type="checkbox"/>  bei alten Bäumen Äste und Zweige überhängend, sonst ist die Krone schmal und spitzkegelig	<input type="checkbox"/>  Äste mehr waagrecht; mit aufrechten, nicht überhängenden Zweigen; häufig mehrstämmig
<u>Rinde</u>	<input type="checkbox"/>  hell weiß; an der Stammbasis mit groben, längsrissigen, schwarzen Leisten (siehe Bild); abblätternd	<input type="checkbox"/>  weniger hell; an der Stammbasis erst spät in schwärzliche Borke übergehend; sich in dünnen Streifen abpollend
<u>Zweige</u>	<input type="checkbox"/> junge Triebe mit warzigen Drüsen besetzt; klebrig; unbehaart	<input type="checkbox"/> junge Triebe dicht kurzflaumig behaart; höchstens mit einzelnen warzigen Drüsen

15 Lokalisation der Birkenpollenprobe (möglichst von nach Süden zeigenden Zweigen =Priorität 1)



16 Höhe der Probenahme  
(möglichst ~ 2 m)

- 1 - 1.5 m   
 1.5 - 2 m   
 2 - 2.5 m   
 ≥ 2.5 m

17 Stammumfang in 1.30 m Höhe

\_\_\_\_|\_\_\_\_|\_\_\_\_| cm

18 Baumhöhe mit Höhenmessgerät bzw. Seite 3 ausfüllen

\_\_\_\_|\_\_\_\_| . \_\_\_\_|\_\_\_\_| m

19 Birkenfoto mit Metermaßstab:

Film-Nr: \_\_\_\_|\_\_\_\_|

(Baum mit DIN A3-Papier (Stationsnummer + Datum) kennzeichnen)

Bild-Nr: \_\_\_\_|\_\_\_\_|

20 Foto von gesammelten Birkenpollen in der Kiste

Bild-Nr: \_\_\_\_|\_\_\_\_|

21 Beurteilung des Reifegrades der Birkenpollen

	1	2	3	4	5			
feucht	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	trocken
hart	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	weich
schwarz	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	gelb
geschlossen	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	offen
unreif	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	_____	<input type="checkbox"/>	reif

22 Kleine Äste sammeln, insgesamt mindestens 5 Knospen, Knospen nicht von den Ästen abbrechen! (15ml Greiner-Tube)

ja  nein

23 Sterile Sammlung von 5 Birkenkätzchen. Birkenkätzchen nicht berühren, abschneiden und in das 50ml Falcon-Tube fallen lassen

ja  nein

\_\_\_\_\_  
Unterschrift eines Probennehmers

## II Baumphotos

### Stadtbirken



5 Heckenstallerstraße



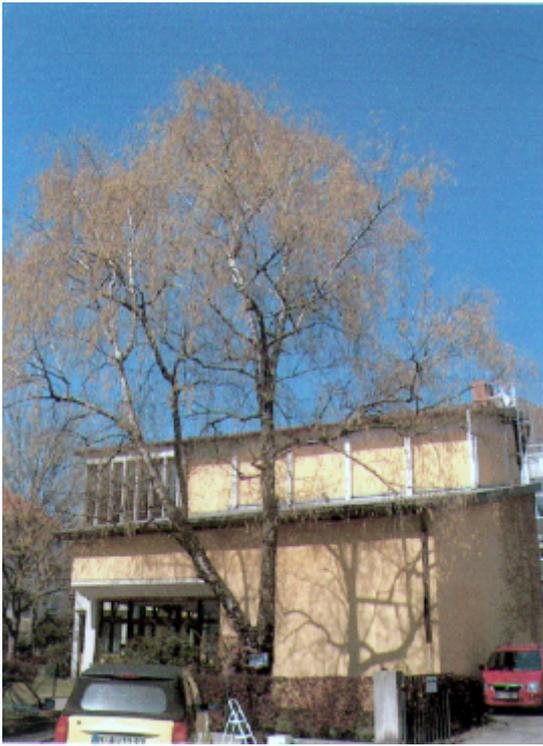
15 Weinbergerstraße



22 Ungerestraße



32 Drygalskiallee



33 Mozartstraße



II Dachauerstraße



III Westendstraße



IV Luise Kiesselbachplatz



Landbirken 2003



100 Landkreis Freising



101 Landkreis Freising



102 Landkreis Freising



103 Landkreis Freising



104 Landkreis Freising



I Johanneskirchen

### III Erhebungsbogen - Baum- und Standortcharakteristika

#### Erhebungsbogen

Stationsnummer			I	I	II	II	III	III
Datum			9.4.	16.4.	9.4.		9.4.	
Sammeljahr			2002	2003	2002	2003	2002	2003
Bemerkung								keine Pollen
Uhrzeit		Punkte	14:50	13:05	09:00	08:35	12:30	
Straßencharakteristik	Wiese	0						
	Nebenstraße mit Tempo 30-Limit	1						
	Nebenstraße ohne Tempo 30-Limit	2	2	2				
	Hauptstraße	3			3	3	3	
Verkehrslage	Anwohnerverkehr	1	1	1				
	Durchgangsverkehr	2			2	2		
	Berufsverkehr	3					3	
Entfernung vom Baum zur nächsten Straße	< 10m	3			3	3	3	
	11-20m	2	2	2				
	> 20m	1						
Entfernung vom Baum zu einer verkehrsreichen Straße	<= 10m	3			3	3	3	
	11-50 m	2						
	51-150m	1						
	> 150 m	0	0	0				
Strassenschlucht	ja					1	1	
	nein		1	1	1			
wenn nein	weniger 100 m							
	nur auf einer Straßenseite							
	geschlossene Häuserzeile				1			
	mind. an einer Seite		1	1				
	freistehende Häuser mit Gärten							
	Verkehrinsel							
	anders		ländlich	ländlich				
Wetter	sonnig			1		1	1	
	überwiegend sonnig							
	bewölkt							
	regnerisch							
Temperatur	°C		21	22	4	15,9	17	
relative Luftfeuchte	% F		43	27	51,3	39,2	28	
Baumcharakteristik	<i>Betula pendula</i>		1	1	1	1		
	<i>Betula pubescence</i>						1	
	Stammumfang m			0,62		0,535		
Reifegrad der Birkenkätzchen	Höhe m			11,2		21		
	trocken	5		3		5		
	weich	5		3		5		
	gelb	5		3		5		
	offen	5		3				
Birkenprobe Entnahme	reif	5		3		1		
	Nord							
	Ost							
	Süd		1	1	1	1	1	
Höhe der Probenentnahme	West							
	1-1.5 m			1				
	1.5-2 m		1		1	1	1	
	2-2.5 m							
Score	>= 2.5 m							
			5	5	11	11	12	

Stationsnummer		IV	IV	V1	V2	5	5	15	15	22	22
Datum		9.4.	16.4.	9.4.	16.4.	9.4.	16.4.	9.4.	16.4.	9.4.	16.4.
Sammeljahr		2002	2003	2003	2003	2002	2003	2002	2003	2002	2003
Bemerkung											
Uhrzeit		11:30	12:15	09:45	09:25	10:30	12:45	11:10	10:30	08:30	08:30
Straßencharakteristik	Wiese										
	Nebenstraße mit Tempo 30-Limit										
	Nebenstraße ohne Tempo 30-Limit	2	2					2	2		
Verkehrslage	Hauptstraße			3	3	3	3			3	3
	Anwohnerverkehr										
	Durchgangsverkehr							2	2		
Entfernung vom Baum zur nächsten Straße	Berufsverkehr	3	3	3	3	3	3			3	3
	< 10m	3	3	3	3	3	3			3	3
	11-20m							2	2		
Entfernung vom Baum zu einer verkehrsreichen Straße	> 20m										
	<= 10m			3	3					3	3
	11-50 m	2	2			2	2				
Strassenschlucht	51-150m							1	1		
	> 150 m										
	ja			1	1					1	
wenn nein	nein	1	1			1	1	1	1		1
	weniger 100 m										
	nur auf einer Straßenseite	1	1								
Baumcharakteristik	geschlossene Häuserzeile					1	1				
	mind. an einer Seite										
	freistehende Häuser mit Gärten										
Wetter	Verkehrinsel										
	andere							Schulhof			Hinterhof
	sonnig	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Temperatur	überwiegend sonnig										
	bewölkt										
	regnerisch										
relative Luftfeuchte	°C	6,7	22,5	19,2	14,9	9	21	9	20	13	13
Baumcharakteristik	% F	24	23	32,6	41,9	29	23	39	33	< 25	33
Baumcharakteristik	<i>Betula pendula</i>	1	1	1	1	1	1	1		1	1
	<i>Betula pubescence</i>										
	Stammumfang m		1,03	0,6	0,453		0,78		0,7		1,28
Reifegrad der Birkenkätzchen	Höhe m		10,5	1,3	7,5		14		13,1		12
	trocken		3	5	5		5		5		4
	weich		3	5	5		5		5		4
Birkenprobe Entnahme	gelb		4	5	5		5		5		4
	offen		3	1	1		5		5		4
	reif						5		5		4
Höhe der Probenentnahme	Nord										
	Ost	1									
	Süd		1	1	1	1	1		1	1	1
Score	West							1			
	1-1.5 m										
	1.5-2 m										
Score	2-2.5 m	1			1	1	1				1
	>= 2.5 m		1	1				1	1	1	
	Score	10	10	12	12	11	11	7	7	12	12

Stationsnummer		32	32	33	33	100	101	102	103	104
Datum		9.4.	16.4.	9.4.	16.4.	25.4.	25.4.	25.4.	25.4.	25.4.
Sammeljahr		2002	2003	2002	2003	2003	2003	2003	2003	2003
Bemerkung										
Uhrzeit		09:30	11:00	13:15	13:40	16:26	16:16	15:40	15:00	15:30
Straßencharakteristik	Wiese					0	0	0	0	0
	Nebenstraße mit Tempo 30-Limit									
	Nebenstraße ohne Tempo 30-Limit			2	2		2			
	Hauptstraße	3	3							
Verkehrslage	Anwohnerverkehr						1			
	Durchgangsverkehr	2	2	2	2					
	Berufsverkehr									
Entfernung vom Baum										
zur nächsten Straße	< 10m	3	3	3	3					
	11-20m						2			
	> 20m					1		1	1	1
Entfernung vom Baum zu										
einer verkehrsreichen Straße	<= 10m	3	3	3	3					
	11-50 m									
	51-150m									
	> 150 m					0	0	0	0	0
Strassenschlucht	ja			1	1					
	nein	1	1			1	1	1	1	1
wenn nein	weniger 100 m									
	nur auf einer Straßenseite									
	geschlossene Häuserzeile									
	mind. an einer Seite									
	freistehende Häuser mit Gärten									
	Verkehrinsel									
	anders	Industrie	1			Land	Land	Land	Land	Land
Wetter	sonnig	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	überwiegend sonnig									
	bewölkt									
	regnerisch									
Temperatur	°C	12,3	18	19	25	20,5	19,9	24,5	20,10	20
relative Luftfeuchte	% F	36	31	25	29	28,3	30,5	32	43,50	37
Baumcharakteristik	<i>Betula pendula</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<i>Betula pubescence</i>									
	Stammumfang m		0,27		1,79	1,28	0,86	0,695	1,2	1,18
	Höhe m		4,8		13	11,7	6,8	9	15	13
Reifegrad der Birkenkätzchen	trocken		5		5	2	4	3	2	2
	weich		5		5	5	2	3	2	5
	gelb		5		5	4	2	3	2	5
	offen		5		5	2	4	4	2	5
	reif		5		5				2	
Birkenprobe Entnahme	Nord									
	Ost	1								1
	Süd	1		1	1		1	1		
	West					1			1	
Höhe der Probenentnahme	1-1.5 m					1				
	1.5-2 m	1	1	1						
	2-2.5 m				1		1	1	1	1
	>= 2.5 m									
Score		11	11	10	10	1	5	1	1	1

## IV Monatsmittelwerte der Umweltmessstationen des Landesamtes für Umweltschutz (LfU)

Tabelle IV.1: Messwerte für das Pollen-Sammeljahr 2002

														Mittelwert
<b>I Johanneskirchen</b>		Mai 01	Jun 01	Jul 01	Aug 01	Sep 01	Okt 01	Nov 01	Dez 01	Jan 02	Feb 02	Mrz 02	Apr 02	Mai 01-April 02
SO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,004	0,005	0,003	0,003	0,003	0,003
CO	mg/m <sup>3</sup>	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,7	0,4	0,4	0,4	0,400
NO	mg/m <sup>3</sup>	0,003	0,003	0,005	0,004	0,007	0,017	0,015	0,012	0,033	0,008	0,01	0,004	0,010
NO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,022	0,021	0,022	0,024	0,023	0,03	0,032	0,03	0,048	0,028	0,031	0,027	0,028
O <sub>3</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,065	0,063	0,062	0,056	0,033	0,018	0,013	0,017	0,02	0,034	0,033	0,043	0,038
Feinstaub	µg/m <sup>3</sup>	28	20	24	28	17	32	25	24	42	20	37	35	27,667
<b>IV Luise Kiesselbachplatz</b>														
SO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005	0,006	0,009	0,004	0,005	0,005	0,005
CO	mg/m <sup>3</sup>	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,9	0,8	0,7	1	0,7	0,8	0,6	0,742
NO	mg/m <sup>3</sup>	0,064	0,071	0,071	0,063	0,095	0,116	0,1	0,083	0,123	0,079	0,098	0,076	0,087
NO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,073	0,071	0,07	0,066	0,054	0,066	0,064	0,056	0,074	0,057	0,072	0,07	0,066
Feinstaub	µg/m <sup>3</sup>	36	28	32	37	27	39	33	31	53	26	45	40	35,583
<b>II Dachauerstraße</b>														
SO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,006	0,009	0,004	0,005	0,004	0,004
CO	mg/m <sup>3</sup>	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	1,2	0,6	0,8	0,6	0,650
NO	mg/m <sup>3</sup>	0,014	0,011	0,012	0,014	0,017	0,048	0,03	0,029	0,062	0,019	0,03	0,016	0,025
NO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,041	0,035	0,039	0,039	0,029	0,039	0,035	0,035	0,05	0,029	0,042	0,039	0,038
<b>V1/ V2Landsbergerstraße</b>														
SO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,003	0,002	0,003	0,002	0,005	0,004	0,004	0,005	0,008	0,004	0,004	0,003	0,004
CO	mg/m <sup>3</sup>	0,6	0,7	0,7	0,7	1	1	1	0,9	1,2	0,9	0,8	0,7	0,850
NO	mg/m <sup>3</sup>	0,033	0,042	0,039	0,038	0,066	0,072	0,068	0,056	0,088	0,056	0,049	0,038	0,054
NO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,051	0,052	0,05	0,05	0,05	0,056	0,056	0,052	0,071	0,053	0,059	0,055	0,055
CnHm-O	mg/m <sup>3</sup>	0,082		0,041	0,047	0,051	0,074	0,049	0,05	0,083	0,052	0,052	0,031	0,056
Feinstaub	µg/m <sup>3</sup>	34	26	30	35	26	39	33	29	48	26	42	39	33,917
<b>III Westendstraße</b>														
SO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,003	0,004	0,006	0,009	0,004	0,005	0,004	0,004
CO	mg/m <sup>3</sup>	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,7	0,6	0,6	1	0,5		0,6	0,573
NO	mg/m <sup>3</sup>	0,013	0,015	0,015	0,017	0,022	0,044	0,038	0,031	0,064	0,024	0,035	0,018	0,028
NO <sub>2</sub>	mg/m <sup>3</sup>	0,039	0,035	0,038	0,039	0,033	0,043	0,044	0,042	0,061	0,039	0,049	0,039	0,042
Feinstaub	µg/m <sup>3</sup>	30	21	25	30	21	43	29	27	46	20	38	33	30,250



## V Polleninhaltsstoffe

### *In vivo* Exposition, Polleninhaltsstoffen in Ammoniumbicarbonat-(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)- Pollenextrakten

Tabelle V.1: Konzentrationen der Pollensubstanzen in 10 mg *in vivo* exponierte *Betula*-Pollen: Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub>), Protein, Allergen Bet v 1. (Aus Vergleichszwecken Werte verdoppelt, aus Pollenextrakt 5mg/ml Ammoniumbicarbonat (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-Puffer). Werte der Standorte 5, 25, 22, 32, 33 und der Jahre 2002 und 2003 von der Doktorandin im ZAUM Sabrina Klaus erstellt.

Nr. Jahr	Standort	PALM <sub>LTB4</sub>		PALM <sub>PGE2</sub>		Protein		Bet v 1	
		MW [pg]	SD [pg]	MW [pg]	SD [pg]	MW [µg]	SD [µg]	MW [ng]	SD [ng]
5_2002	Heckenstallerstraße	156,00		146,00		89,03		1616,00	
5_2003	Heckenstallerstraße	51,00	9,60	666,86	150,40	69,66	4,40	8084,66	807,69
15_2002	Weinbergerstraße	158,00		346,00		82,49		1142,00	
15_2003	Weinbergerstraße	111,40	8,06	713,78	116,74	71,28	7,16	2342,00	45,08
22_2002	Ungererstraße	1096,00		684,00		111,01		108,40	
22_2003	Ungererstraße	111,58	6,64	1980,12	111,58	85,24	9,10	1836,66	417,34
32_2002	Drygalskiallee	88,00		70,00		100,90		4596,00	
32_2003	Drygalskiallee	49,72	0,42	88,74	32,56	31,32	1,00	15028,00	1144,32
33_2002	Mozartstraße	510,00		1838,00		92,15		127,20	
33_2003	Mozartstraße	247,38	4,68	679,74	203,70	54,04	18,80	8316,66	715,56
I_2002	Johanneskirchen	250,19	60,51	386,40	176,82	67,35	4,07	1738,00	282,92
I_2003	Johanneskirchen	142,08	29,54	591,27	168,78	85,65	11,52	11712,00	2377,70
II_2002	Dachauerstraße	390,55	299,36	4735,91	1565,32	135,68	20,89	186,74	20,64
II_2003	Dachauerstraße	502,98	68,89	3770,34	236,23	129,04	15,66	1178,00	174,88
III_2002	Westendstraße	828,06	283,31	2438,53	182,50	117,01	4,89	632,00	0,00
IV_2002	Luise-Kiesselbachplatz	114,82	31,38	354,06	40,10	78,11	21,94	5994,66	923,90
IV_2003	Luise-Kiesselbachplatz	82,74	7,80	646,90	415,51	59,92	7,49	3482,00	372,04
V1_2003	Landsbergerstr. 462	64,68	9,92	657,99	661,59	65,88	34,79	4912,00	2086,40
V2_2003	Landsbergerstr. 469	89,10	7,21	1175,14	498,69	100,86	3,47	768,00	346,50
100_2003	Landkreis Freising	176,08	10,33	517,72	44,08	80,28	11,15	3770,66	870,84
101_2003	Landkreis Freising	63,15	9,73	272,90	116,39	56,03	5,80	2146,00	627,90
102_2003	Landkreis Freising	135,48	47,90	1039,52	342,37	86,63	23,02	192,14	87,22
103_2003	Landkreis Freising	280,96	65,97	3189,46	472,96	102,64	4,46	72,04	55,98
104_2003	Landkreis Freising	67,71	15,82	182,75	97,34	60,39	2,14	2240,00	194,64

### ***In vivo* Exposition, Polleninhaltsstoffe in RPMI-Pollenextrakten**

Tabelle V.2: Konzentrationen der Pollensubstanzen in 10 mg *in vivo* exponierten *Betula*-Pollen; Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALM<sub>LTB4</sub>, PALM<sub>PGE2</sub>) und Protein, aus Pollenextrakt 10 mg/ml RPMI-Medium.

Nr. Jahr	Standort	PALM <sub>LTB4</sub>	PALM <sub>LTB4</sub>	PALM <sub>PGE2</sub>	PALM <sub>PGE2</sub>	Protein	Protein
		MW [pg]	SD [pg]	MW [pg]	SD [pg]	MW [µg]	SD [µg]
5_2002	Heckenstallerstraße	46,18	21,30	90,96	3,32	49,06	4,23
5_2003	Heckenstallerstraße	40,40	18,14	161,35	36,29	44,86	7,52
15_2002	Weinbergerstraße	47,42	26,25	151,82	89,74	42,95	3,47
15_2003	Weinbergerstraße	74,74	52,45	362,73	55,31	35,89	3,90
22_2002	Ungererstraße			218,57	81,88	55,24	0,06
22_2003	Ungererstraße	93,47	47,92	74,05	12,37	35,89	6,88
32_2002	Drygalskiallee	16,13	11,42	20,72	13,45	68,88	12,46
32_2003	Drygalskiallee	33,37	13,62	114,61	39,10	71,62	17,48
33_2002	Mozartstraße	187,16	40,52	1227,93	83,14	35,24	11,13
33_2003	Mozartstraße	67,85	31,28	365,83	83,15	64,74	17,26
I_2002	Johanneskirchen	70,48	38,17	144,26	96,42	33,25	2,63
I_2003	Johanneskirchen	40,25	12,10	179,13	43,34	40,53	13,36
II_2002	Dachauerstraße	121,59	50,23	564,91	149,58	37,56	7,44
II_2003	Dachauerstraße	61,77	5,67	500,65	27,73	37,70	2,49
IV_2002	Luise-Kiesselbachplatz	38,05	6,62	167,31	59,75	44,56	2,36
IV_2003	Luise-Kiesselbachplatz	28,73	18,57	151,73	86,51	38,77	2,94
V1_2003	Landsbergerstraße 462	22,42	9,75	124,74	47,31	38,55	5,49
V2_2003	Landsbergerstraße 469	39,95	8,97	398,82	94,96	27,13	1,83
100_2003	Landkreis Freising	34,80	7,91	201,30	17,52	45,37	7,75
101_2003	Landkreis Freising	25,60	8,50	49,86	17,96	39,58	7,40
102_2003	Landkreis Freising	89,87	59,28	604,61	113,12	32,76	5,12
103_2003	Landkreis Freising	96,52	40,23	857,83	125,20	29,16	3,54
104_2003	Landkreis Freising	35,90	12,55	70,28	38,31	49,49	6,92

## VI Migrationindizes

Tabelle VI.1: Migrationindizes der *in vivo* exponierten Pollen (n=2)

Standort	Nr.	Jahr	Mittelwert Migrationsindex		
			1 mg Pollen	3 mg Pollen	10 mg Pollen
Heckenstallerstraße	5_02	2002	0,39	0,47	0,45
Heckenstallerstraße	5_03	2003	0,41	0,54	0,41
Weinbergerstraße	15_02	2002	0,49	0,50	0,54
Weinbergerstraße	15_03	2003	0,37	0,57	0,60
Ungererstraße	22_03	2003	0,42	0,52	0,38
Drygalskiallee	32_02	2002	0,38	0,47	0,51
Drygalskiallee	32_03	2003	0,35	0,43	0,42
Mozartstraße	33_02	2002	0,36	0,41	0,41
Mozartstraße	33_03	2003	0,36	0,46	0,36
Johanneskirchen	I_02	2002	0,31	0,41	0,54
Johanneskirchen	I_03	2003	0,33	0,41	0,47
Dachauerstraße	II_02	2002	0,33	0,27	0,33
Dachauerstraße	II_03	2003	0,31	0,35	0,24
Luise-Kiesselbachplatz	IV_02	2002	0,31	0,39	0,34
Luise-Kiesselbachplatz	IV_03	2003	0,27	0,31	0,40
Landsbergerstraße	V1_03	2003	0,29	0,31	0,24
Landsbergerstraße	V2_03	2003	0,30	0,31	0,25
Landkreis_Freising	100_03	2003	0,19	0,24	0,36
Landkreis_Freising	101_03	2003	0,28	0,33	0,36
Landkreis_Freising	102_03	2003	0,29	0,30	0,35
Landkreis_Freising	103_03	2003	0,31	0,30	0,31
Landkreis_Freising	104_03	2003	0,32	0,32	0,35

Tabelle VI.2: Migrationindizes der *in vitro* exponierten Pollen

Art	Expositionsbedingungen			Konzentration Pollen [mg]	Mittelwert MI	Standard- abweichung	Anzahl n	Versuchsnr.
	Exposition	%rF	Dauer [h]					
<i>Betula</i>	Kontrolle	30	16	1	0,77	0,32	3	IV_K
				3	0,53	0,18	3	
				10	0,45	0,31	3	
	Schwefeldioxid	30	16	1	0,43	0,09	3	IV_SO <sub>2</sub>
				3	0,40	0,12	3	
				10	0,67	0,17	3	
	Kontrolle	50	16	1	0,44	0,24	3	III_K
				3	0,43	0,08	3	
				10	0,33	0,04	3	
	Schwefeldioxid	50	16	1	0,45	0,22	3	III_SO <sub>2</sub>
				3	0,46	0,19	3	
				10	0,36	0,05	3	
	Kontrolle	70	16	1	0,38	0,23	3	V_K
				3	0,46	0,15	3	
				10	0,50	0,07	3	
	Schwefeldioxid	70	16	1	0,30	0,07	3	V_SO <sub>2</sub>
				3	0,57	0,23	3	
				10	0,49	0,16	3	
Kontrolle	50	6	1	0,47	0,28	2	VIII_K	
			3	0,36	0,04	2		
			10	0,23	0,20	2		
Partikel	50	6	1	0,30	0,02	2	VIII_P	
			3	0,29	0,18	2		
			10	0,34	0,05	2		
<i>Phleum</i>	Kontrolle	50	4	1	0,48	0,04	2	VII_K
				3	0,51	0,06	2	
				10	0,52	0,21	2	
	Partikel	50	4	1	0,29	0,02	2	VII_P
				3	0,36	0,01	2	
				10	0,62	0,20	2	
	Kontrolle	50	6	1	0,27	0,13	2	IX_K
				3	0,27	0,05	2	
				10	0,31	0,04	2	
	VOC	50	6	1	0,22	0,06	2	IX_VOC
				3	0,26	0,04	2	
				10	0,37	0,05	2	

**VII Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich für die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:  
Molekularbiologische und zellbiologische Charakterisierung von allergenen Pollen – unter besonderer Berücksichtigung von Umwelteinflüssen  
in der Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie/ ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt unter der Anleitung und Betreuung durch Professor Dr. med. Heidrun Behrendt und Professor Angelika Görg ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Absatz 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und ich bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad gescheitert.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität ist mir bekannt.

München, den

### **VIII Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank geht an Frau Professor Heidrun Behrendt, Leiterin des Zentrums Allergie und Umwelt, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Unterstützung während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit

Mein besonderer Dank geht an Frau Professor Angelika Görg, Leiterin des Fachgebiets Proteomik, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Umwelt und Landnutzung, für die ausgezeichnete Unterstützung des Proteomik-Forschungsschwerpunktes dieser Doktorarbeit, der in Ihrem Labor durchgeführt werden konnte.

Mein besonderer Dank geht an Frau PD Dr. Claudia Traidl-Hoffmann für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit

Des weiteren möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen des Zentrums Allergie und Umwelt und des Fachgebiets Proteomik für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die Unterstützung bedanken.

Bei meiner Familie und Herrn Ewan Bryce möchte ich mich herzlich für die langjährige Unterstützung bedanken.