

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein  
der Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. J. Ring)

**Untersuchung zur Bedeutung der relativen Luftfeuchte  
für die Allergenfreisetzung aus Pollen**

Johannes Huss-Marp

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt  
2. Univ.-Prof. Dr. D. Abeck

Die Dissertation wurde am 14.06.2000 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.11.2000 angenommen.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie, GSF-Forschungszentrum Umwelt und Gesundheit, Neuherberg / Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. med. H. Behrendt.

Ein Teil der experimentellen Arbeit wurde in der Abteilung für experimentelle Dermatologie und Allergologie an der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg durchgeführt.

Für Maria, Pauline und Frederik

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen.....	7
1.1.1 Prävalenz von Allergien.....	7
1.1.2 Epidemiologische Studien im Ost-West-Vergleich.....	8
1.1.3 Epidemiologische Studien zur Assoziation zwischen anthro- pogenen Umweltfaktoren und allergischen Erkrankungen.....	9
1.2 Allergotoxikologie.....	11
1.3 Experimentelle Versuchsansätze.....	12
1.4 Allergie und Pollen.....	15
1.4.1 Aerobiologie von Pollen.....	18
1.4.2 Beeinflussung des Pollenfluges durch natürliche Umweltfaktoren.	20
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1 Material.....	24
3.1.1 Pollen.....	24
3.1.2 Gase.....	25
3.1.3 Monoklonale Antikörper und Patientensera.....	26
3.1.4 Geräteliste.....	26
3.1.5 Chemikalien und Materialien.....	27
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Pollenexpositionsversuche.....	29
3.2.2 Extraktion der Proteine und Allergene.....	33
3.2.3 Protein- und Allergenbestimmung.....	36
3.2.4 Mikroskopie.....	42
3.2.5 Statistische Methoden.....	43

<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
4.1 Funktionsprüfung der Expositionsanlage.....	44
4.2 Verhalten der Pollen während der Exposition gegenüber synthetischer Luft (0 % rF).....	45
4.3 Einfluß der relativen Luftfeuchte auf Pollen.....	53
4.4 Einfluß von Schwefeldioxid auf Pollen.....	68
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>72</b>
5.1 Einfluß von Luftfeuchte auf die Protein- und Allergenfreisetzung aus Pollen.....	72
5.2 Einfluß von Schwefeldioxid auf die Exposition von Pollen bei relativen Luftfeuchten von 80 % rF.....	76
5.3 Beurteilung der Befunde in Hinblick auf natürliche Bedingungen während des Pollenfluges.....	78
5.4 Allergologische Relevanz der Befunde.....	79
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>105</b>
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>106</b>
<b>10. Anhang.....</b>	<b>107</b>
10.1 Daten.....	107

## Verzeichnis der Abkürzungen

<i>A. bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
AC-Puffer	Ammoniumcarbonatpuffer
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CAP	Carrier-Polymer-System
°C	Grad Celsius
D	Deutschland
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
KD	Kilodalton
M	molar
mAb	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MW	Molekulargewicht
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NL	Niederlande
Ps	Patientenserum
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
rF	relative Luftfeuchte
S	Schweden
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
STD	Standardabweichung
t	Tonne
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin
TRIS	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan

## 1. Einleitung

### 1.1 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

#### 1.1.1 Prävalenz von Allergien

Allergologische Erkrankungen stellen heute ein großes umweltmedizinisches Problem dar [121]. Nach Schätzungen des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen [1] sind 24 bis 32 Mio. Deutsche allergisch vorbelastet.

Epidemiologische Querschnittsuntersuchungen haben gezeigt, dass die Prävalenz allergischer Erkrankungen innerhalb der letzten Jahrzehnte weltweit zugenommen hat [99].

So konstatiert WÜTHRICH [141] für Erkrankungen des atopischen Formenkreises, insbesondere die Pollenallergie, einen deutlichen Anstieg der Prävalenz innerhalb der vergangenen Jahrzehnte. Als mögliche, für diese Entwicklung mitverantwortliche Kofaktoren nennt er die Luftverunreinigung sowie die verstärkte Exposition gegenüber neuen Allergenen durch veränderte Lebensgewohnheiten.

Epidemiologische Studien aus Finnland [46], Großbritannien [21], Japan [106] sowie Australien [93] weisen auf einen deutlichen Anstieg der Asthmaprävalenz hin. Dieser weltweite Trend ist nach Ansicht von WOOLCOOK *et al.* [140] weder auf eine erhöhte Allergenbelastung, noch ausschließlich auf eine veränderte Praxis bei der Diagnosestellung zurückzuführen. Auch KUNZ *et al.* [75] geben sowohl für Allergien des Respirationstraktes, als auch für andere allergische, insbesondere atopische Erkrankungen eine entsprechende Entwicklung an.

Für das atopische Ekzem konnten SCHULZ LARSEN *et al.* [113] anhand von Zwillingsstudien einen Anstieg der kumulativen Inzidenz des atopischen Ekzems von 3,2 % der in den Jahren 1960 bis 1964 geborenen Kinder auf 11,5 % der in den Jahren 1975 bis 1979 geborenen Kinder feststellen. Auch SCHÄFER *et al.* [108] beschreiben für die letzten Dekaden einen hochsignifikanten Anstieg der Prävalenz des atopischen Ekzems.

### 1.1.2 Epidemiologische Studien im Ost-West-Vergleich

Die der zunehmenden Allergieprävalenz zugrundeliegende Ursache ist unbekannt, jedoch werden ausgehend von epidemiologischen Studien [71; 72; 73; 88; 89; 107] verschiedener Gruppen, die Ost- und Westdeutschland seit der Wiedervereinigung verglichen, eine Reihe möglicher Faktoren diskutiert: Neben Lifestyle-Faktoren („westlichem Lebensstil“) [137], einer geringeren Stimulation des (früh-)kindlichen Immunsystems (Infektions- und Impfstatus), dem Auftreten neuer Allergene und der Zunahme von Aeroallergenen in Außenluft- und Innenraumbereich kommt eine allergiefördernde Wirkung von Umweltverunreinigungen, insbesondere durch verkehrsbedingte Emissionen [74] in Betracht.

Epidemiologische Studien ergaben übereinstimmend niedrigere Raten für die Prävalenz allergischer Erkrankungen des Respirationstraktes sowie weniger allergologische Sensibilisierungen für die ostdeutschen Bundesländer im Vergleich zu dem ehemaligen Westdeutschland. Dagegen traten in Ostdeutschland vermehrt allergische Hauterkrankungen sowie Reizungen und Infektionen der oberen Atemwege auf [10; 107]. In Vergleichsstudien die VON MUTIUS *et al.* [88; 89] zur Prävalenz asthmatischer und anderer allergischer Erkrankungen bei Schulkindern in Leipzig und München durchführten, wurde bei den Kindern in München deutlich häufiger allergisches Asthma bronchiale und allergische Rhinokonjunktivitis diagnostiziert, wohingegen in Leipzig die Bronchitisprävalenz im Vergleich deutlich erhöht war. Der diesem Befund zugrundeliegende Mechanismus ist unbekannt, doch weisen die Autoren auf eine deutliche Korrelation mit einer unterschiedlichen Schadstoffbelastung in beiden Regionen hin: So wurde zum Zeitpunkt der Studie die Schadstoffbelastung der Außenluft in Leipzig durch Schwefeldioxid und Schwebstaub, in München primär durch die Abgase von Kraftfahrzeugen charakterisiert. In einer weiteren, groß angelegten Untersuchung konnten KRÄMER *et al.* [71] anhand der an über 17.000 Kindern im Vorschulalter erhobenen Daten Luftverschmutzung als Risikofaktor für allergische Erkrankungen am Vergleich von Ost- und Westdeutschland identifizieren. Für

Westdeutschland fand sich eine positive Korrelation allergischer Erkrankungen zur Nähe des Wohnortes zu einer Straße mit hohem Kraftfahrzeugaufkommen, nicht jedoch für Ostdeutschland. Für Schwefeldioxid und partikuläre Luftschadstoffe konnte in Vergleichsstudien von Ost- und Westdeutschland kein Zusammenhang zur Manifestation allergischer Erkrankungen nachgewiesen werden. Nichtallergische Atemwegserkrankungen zeigten dagegen eine positive Korrelation zu den beiden genannten Schadstoffen [72; 73].

In den ersten Verlaufsbeobachtungen nach der Wiedervereinigung konnte parallel zur Änderung der Lebensgewohnheiten, einem deutlichen Anstieg des Verkehrsaufkommens und dem Rückgang der Belastung mit den klassischen Luftschadstoffen ein Anstieg der Allergiehäufigkeit in den neuen Bundesländern festgestellt werden [90; 107].

### **1.1.3 Epidemiologische Studien zur Assoziation zwischen anthropogenen Umweltfaktoren und allergischen Erkrankungen**

#### *Kfz-bedingte Immissionen und Allergien*

Bereits 1987 konnten durch ISHIZAKI *et al.* [58] erstmals gezeigt werden, daß verkehrsbedingte Immissionen als verstärkender Faktor bei der Pathogenese der japanischen Zedernpollinosis beteiligt sein könnten. Die Inzidenz dieser in Japan häufigsten Inhalationsallergie war bei gleicher Pollenexposition für Menschen, die in unmittelbarer Nähe von Straßen mit hohem Kraftfahrzeugverkehr lebten, gegenüber Bewohnern der Zedernwälder deutlich erhöht.

Eine Reihe weiterer Untersuchungen zur Assoziation zwischen anthropogenen Umweltfaktoren und Allergien fanden in verschiedenen europäischen Ländern statt: So konnte in 12 großen epidemiologischen Studien, die in den Jahren 1993 bis 1999 von unterschiedlichen Gruppen [32; 33; 74; 80; 92; 95; 114; 124; 130; 132; 134; 138] durchgeführt wurden, mittels Fragebogenaktionen oder Messungen von Expositionsbedingungen weitere Daten erhoben werden. Vier der Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und dem Symptom „pfeifende Atemgeräusche“ [32; 92; 95; 134], in drei Studien wurde eine Assoziation zu Asthma festgestellt [33; 124; 130]. Zwei in Deutschland

durchgeführte Untersuchungen ergaben einen signifikanten Zusammenhang zwischen Lastwagenverkehr in der Wohnstraße und Symptomen einer allergischen Rhinitis [74; 114], wohingegen in drei der zitierten Arbeiten keine derartigen Zusammenhänge festgestellt werden konnten [80; 132; 138].

### *Reizgase (SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>), Partikuläre Luftschadstoffe und Allergien*

In einer retrospektiven Studie konnten ITO *et al.* [59] für Perioden extremer Luftverschmutzung in London mit Schwefeldioxid, partikulären Schadstoffen sowie sauren Aerosolen für die Jahre 1952 und 1962 einen deutlichen, schadstoffassoziierten Anstieg der Mortalität nachweisen, ohne daß eine Zuordnung zu einer einzelnen Noxe möglich gewesen wäre.

In einer Studie aus dem Jahre 1987 konnten von ANDRAE *et al.* [2] mittels einer Fragebogenaktion eine signifikant erhöhte Prävalenz für allergische Rhinokonjunktivitis sowie allergisches Asthma (insbesondere Birkenpollen-assoziiert) bei Kindern, die in der Umgebung einer Papierproduktionsanlage lebten, nachgewiesen werden. Neben etwa 1 t partikulärer Luftschadstoffe wurden von dieser täglich unter anderem 0,5 t Schwefeldioxid in die umgebende Atmosphäre abgegeben. Auch HENRY *et al.* [48] stellten bei australischen Grundschulkindern, welche in der Nähe eines Stromkraftwerks lebten, wo erhöhte atmosphärische Konzentrationen an Schwefeldioxid und Stickoxiden gemessen werden konnten, eine gegenüber der Kontrollpopulation verdoppelte Asthmaprävalenz fest. Eine finnische Arbeitsgruppe [102] konnte im Jahre 1993 eine signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten Belastung mit Stickoxiden und asthmabedingten Besuchen der Notaufnahme des Universitätskrankenhauses nachweisen.

## 1.2 Allergotoxikologie

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Schadstoffbelastung und Allergieerkrankungen aufzuklären, ist ein multifaktorieller, interdisziplinärer Forschungsansatz notwendig, wie ihn BEHRENDT [8] mit dem Konzept der Allergotoxikologie vorstellte. Die Allergotoxikologie beschäftigt sich wissenschaftlich mit der Entstehung, Auslösung und Unterhaltung allergischer Reaktionen unter dem Einfluß von Schadstoffen [8]. Zu diesem Zweck kommen, ausgehend von den epidemiologischen Untersuchungen, experimentelle Versuchsansätze und klinische Studien zum Einsatz. Die Notwendigkeit, Wechselwirkungen zwischen Luftverunreinigung und Aeroallergenen im Sinne der Allergotoxikologie zu untersuchen, wird auch in einem Positionspapier des EAACI Subkomitees „Aerobiologie and Environmental Aspects of Inhalant Allergenes“ betont [24].

### *Typen der Luftverunreinigung*

BEHRENDT *et al.* [11] unterscheiden zwischen Typ I- und Typ II-Luftverunreinigung. Als Typ-I-Luftschadstoffe werden Schwefeldioxid und atmosphärischer Schwebstaub (total suspended matter) bezeichnet. Unter Typ-II-Luftschadstoffen versteht man Stickoxide, gasförmige organische Verbindungen, Ozon und PM<sub>2,5</sub> (partikuläre Substanzen mit einem aerodynamischen Durchmesser von unter 2,5 µm). Typ-I-Luftschadstoffe fallen primär bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe, wie Kohle und Öl an und waren kennzeichnend für die Luftverschmutzung in Osteuropa. Typ-II-Luftschadstoffe sind typischerweise in den Staaten der industrialisierten "westlichen Welt" zu finden und werden zu einem Großteil durch Kraftfahrzeugverbrennungsmotoren verursacht. In stark mit Typ-I-Luftschadstoffen verunreinigten Gebieten stehen chronisch-irritative Erkrankungen der Atemwege im Vordergrund, wohingegen eine Belastung mit Typ-II-Luftschadstoffen mit einer erhöhten Prävalenz an Allergierkrankungen einhergeht [6].

Da sich mit epidemiologischen Untersuchungen zwar Korrelationen, nicht jedoch Kausalitäten, aufdecken lassen, kann eine weitere Klärung der Zusammenhänge nur mit experimentellen Versuchsansätzen erfolgen.

### 1.3 Experimentelle Versuchsansätze

Aufgrund der Komplexität des Systems Luftschadstoff-Allergen-Allergiker sind verschiedene Wirkungsweisen denkbar und so werden auch unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt.

Am *in vitro*-Modell wurde an humanen bronchialen Epithelzellen die adjuvante Wirkung von Schadgasen auf die Allergieentstehung untersucht: RUSZNAK *et al.* [105] konnten in der Zellkultur eine Erhöhung der epithelialen Permeabilität sowie eine reduzierende Wirkung von NO<sub>2</sub> auf die Schlagfrequenz der Zilien auf humanem Bronchialepithel nachweisen. Sowohl für Ozon-, als auch für NO<sub>2</sub>-Exposition der Zellkulturen konnte darüber hinaus eine verstärkende Wirkung auf die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (LTC<sub>4</sub>, GM-CSF, TNF $\alpha$  und IL-8) gezeigt werden [27].

Tierexperimentell wurde in Expositionsversuchen eine direkte Wirkung der Luftschadstoffe auf den Prozess der allergischen Sensibilisierung untersucht: MIYAMOTO [84] stellte in Studien an Kaninchen und Meerschweinchen einen signifikant höheren Antikörpertiter bei Tieren fest, die vor Allergen-Applikation gegenüber 300 bis 400 ppm SO<sub>2</sub> exponiert worden waren.

In der von TAKAFUJI *et al.* [127] durchgeführten tierexperimentellen Studie zum Einfluß von Dieselabgaspartikeln auf die Immunantwort auf intranasal verabreichtes Ovalbumin bei Mäusen, konnte eine deutliche Adjuvanswirkung auf die IgE-Bildung gefunden werden.

Unter kontrollierten Bedingungen wurden auch am Menschen Untersuchungen zum Einfluß von Luftschadstoffen durchgeführt. Dieser Ansatz wird mit der Durchführung von humanen Expositionsversuchen von der Arbeitsgruppe um MAGNUSSEN [61; 62; 81] verfolgt, die zeigen konnte, daß SO<sub>2</sub>, insbesondere bei vorbestehender Atemwegserkrankung, zu einer Obstruktion führen kann, wenn es zusammen mit anderen Umweltstoffen mit bronchospastischer Wirkung appliziert

wird. Für die Exposition mit den Schadstoffen Ozon und NO<sub>2</sub> konnte eine Erhöhung der Atemwegsreagibilität beobachtet werden.

Neben der direkten Schadstoffwirkung auf den Respirationstrakt gibt es jedoch auch eine Reihe von Hinweisen auf eine Wirkung von Umweltschadstoffen auf Allergenträgerebene: In *in vitro*-Experimenten konnten BEHRENDT *et al.* [7] einen Effekt wässriger Extrakte atmosphärischer Schwebstäube auf Gräserpollen der Art *Dactylis glomerata* nachweisen. Nach Inkubation der Pollen mit den Extrakten zeigten sich elektronenmikroskopisch sichtbare morphologische Veränderungen von Pollenoberfläche und Protoplasma, eine gesteigerte Proteinfreisetzbarkeit sowie ein verändertes Reaktionsmuster im Immunoblot [26]. Die Ergebnisse weisen auf eine Veränderung der Allergenität der Pollen durch an Schwebstäube adsorbierte Substanzen sowie eine Wechselwirkung im Sinne der Aufnahme der aus dem Pollen freigesetzten Allergene durch die Schwebstaubpartikel hin [9].

Weitere Hinweise für eine Wechselwirkung zwischen Schadstoff und Pollenallergenen kommen von KNOX *et al.* [70]: Die australische Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe monoklonaler Antikörper zeigen, daß das Hauptallergen des Lolchs Lol p1 unter *in vitro*-Bedingungen an partikuläre Verbrennungsrückstände aus Dieselmotoren bindet. Die Arbeitsgruppe um RUFFIN [104] konnte bereits 1983 in *in vitro*-Expositionsversuchen von verschiedenen Baumpollen (*Ulmus pumila*, *Quercus rubra*, *Pinus taeda*, *Festuca elatior*) mit den gasförmigen Schadstoffen SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> und CO elektrophoretisch qualitative Veränderungen der Pollenwandproteine nachweisen. In einer 1984 von derselben Gruppe [103] veröffentlichten Untersuchung konnte anhand eines Histamin-Freisetzungstests mit von Allergikern gewonnenen Leukozyten sowie mit Kaninchenantiserum gezeigt werden, daß Extrakte von Pollen der Art *Quercus rubra* nach Exposition mit den genannten Schadgasen eine erhöhte Allergenität aufweisen. Eine Analyse des Aminosäuregehaltes der Extrakte schadgasexponierter Pollen mittels Chromatographie und SDS-PAGE zeigte qualitative und quantitative Veränderungen [104]. THOMAS *et al.* [128] zeigten in *in vitro*-Expositionsversuchen von Pollen der Arten *Secale cereale*, *Betula alba* und *Fraxinus pennsylvanica* für die Schadgase SO<sub>2</sub> (900 ppb), NO<sub>2</sub> (50 bis 400 ppb) und O<sub>3</sub> (300 ppb) eine im Vergleich zu nativen Pollen erhöhte

Proteinfreisetzbarkeit und gesteigerte Histaminfreisetzung nach Inkubation der Extrakte mit basophilen Leukozyten allergischer Patienten [129]. Im Pricktest mit Extrakten der schadgasexponierten Pollen konnte bei Allergikern eine verstärkte Hautreaktion im Vergleich zu Extrakten unbehandelter Pollen ausgelöst werden.

In den von FRITZSCHE *et al.* [40] durchgeführten *in vitro*-Expositionsversuchen kam erstmalig das Prinzip des Wirbelschichtreaktors zur Anwendung, wodurch gleichmäßige Expositionsbedingungen für alle Pollen erreicht wurden. Die Aufarbeitung der mit SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> und synthetischer Luft exponierten Pollen der Art *Phleum pratense* erfolgte mittels wässriger Proteinextraktion, SDS-PAGE sowie Immunoblotting und Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern und Serum allergischer Patienten. Es konnte ein signifikanter, zeitabhängiger Einfluß der relativen Luftfeuchte auf die Proteinfreisetzung der Pollen nachgewiesen werden, wobei Extrakte bei 0 % rF exponierter Pollen einen gegenüber dem Ausgangswert erhöhten, bei 90 % rF exponierter Pollen einen reduzierten Proteingehalt aufwiesen [39]. Im Immunoblot zeigte sich für die Majorallergene des Wiesenlieschgrases bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit ein zeitabhängiger Verlust von Phl p 1, nicht jedoch von Phl p 5 [38]. Bei Expositionen von Wiesenlieschgraspollen mit 16500 µg SO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> bei 80 % relativer Luftfeuchte zeigte sich eine deutliche Abnahme von Phl p 5 im Immunoblot, die auch mittels ELISA-Technik zu verifizieren war sowie eine Reduktion des Gesamtproteingehaltes der Extrakte gegenüber nicht SO<sub>2</sub>-exponierten Pollen. Für die Exposition mit NO<sub>2</sub> konnte kein Einfluß auf die Reaktivität im Immunoblot nachgewiesen werden [12].

Bei der Untersuchung von Pollen, welche einerseits auf einer Wiese, andererseits am Straßenrand gesammelt worden waren und sich hinsichtlich ihrer Exposition gegenüber Kraftfahrzeugabgasen erheblich unterschieden, konnten von BEHRENDT *et al.* [13] deutlich unterschiedliche Allergenfreisetzungen nachgewiesen werden. Mittels ELISA konnte für Phl p 5 eine signifikant niedrigere Allergenfreisetzung aus den in Straßennähe gesammelten Pollen im Vergleich zu den aus der ländlichen Gegend stammenden Pollen festgestellt werden. Im Vergleich zu käuflich erworbenen zeigten die an beiden Lokalisationen gesammelten Pollen eine hochsignifikant gesteigerte Allergenfreisetzung.

Als weiterer wichtiger Befund konnte in der genannten Arbeit das Vorkommen der Eikosanoiden Prostaglandin  $E_2$  und Leukotrien  $B_4$  in Pollen sowie deren Freisetzung im Rahmen der Allergenliberation nachgewiesen werden. Eine Entdeckung, die möglicherweise hilft die Frühphase der allergischen Sensibilisierung besser zu verstehen.

#### 1.4 Allergie und Pollen

Der Begriff „Allergie“ wurde 1906 von C. VON PIRQUET [97] eingeführt, um pathologische von physiologischen Immunreaktionen abzugrenzen. Heute versteht man unter Allergie eine krankmachende Überempfindlichkeit aufgrund einer spezifischen immunologischen Sensibilisierung [100]. Allergien gehören zu den wenigen Erkrankungen, in deren Entstehung und Auslösung Umweltfaktoren natürlichen und anthropogenen Ursprungs („Allergene“) als Ursache eindeutig erkannt und häufig chemisch charakterisiert sind (s. auch Tab. 1.4-1) [121].

Bereits im Jahre 1873 konnte Blackley [23] experimentell den kausalen Zusammenhang zwischen aerogener Pollenbelastung und der Intensität allergischer Symptome beim Pollenallergiker aufzeigen und so erstmals Pollen als allergieauslösendes Agens identifizieren. Der Name „Pollen“ wurde vom schwedischen Naturforscher LINNAEUS [67] bereits 1760 geprägt und leitet sich vom lateinischen Wortstamm „póllos“ ab, der ursprünglich "sehr feines Mehl" bedeutete [112]. Im Griechischen heißt „pollós“ „viel“ was gut mit der großen Anzahl freigesetzter Pollenkörner übereinstimmt [112]. In der Palynologie, der Pollenkunde, werden die Pollen nach botanischen, morphologischen und biochemischen Kriterien eingeteilt [100]. Pollen sind die Träger der männlichen Erbinformation und für die sexuelle Reproduktion von Pflanzen essentiell. Sie haben eine Größe von 5 bis zu über 200  $\mu\text{m}$  und bestehen aus zwei oder drei Zellen, welche zu einer Einheit verbunden sind [122]. Gemeinsames Bauprinzip der Pollen ist der Aufbau aus einer vegetativen Zelle, deren Plasmamembran von der Pollenwand umgeben ist und die neben den Zellorganellen den vegetativen Nukleus sowie eine generative Zelle enthält. Da die Teilung der generativen Zelle

bei verschiedenen Pflanzengattungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt - entweder während der Keimung oder wie bei Gräsern schon während der Reifung - bezeichnet man die Pollen als bi- oder trinukleär [54]. Die Pollenwand selbst besteht aus einer inneren Intine, welche aus Polysacchariden aufgebaut ist, und einer äußeren Exine, welche aus dem sehr widerstandsfähigen Sporopollenin, einem Karotinoid-Ester-Polymer, gebildet wird [115]. Pollen der meisten Pflanzen verfügen über eine Exine, nur bei einigen Wasserpflanzen ist sie stark reduziert. Oberflächenstruktur der Exine, Anzahl der Keimöffnungen sowie Pollenform sind speziesspezifisch und für die morphologische Klassifikation der Pollen von Bedeutung [68]. Nach Art des Bestäubungsmodus, der den Transport des Pollens vom Ort der Reifung, dem Anther, zum Ort der Keimung, dem Stigma, einer anderen Pflanze beschreibt, unterscheidet man anemophile, windbestäubende Pflanzen, von entemophilen, d.h. solchen, die sich selbstgerichteter Vektoren, wie etwa Insekten, bedienen. Nur etwa 30 der über 300 blütenbildenden Pflanzenfamilien sind anemophil. Diese sind jedoch fast ausschließlich für die durch Pollen induzierten Allergien verantwortlich. Während Pollen entemophiler Pflanzen durch eine klebrige, auf der Pollenoberfläche befindliche Substanz, den Pollenkitt, gekennzeichnet sind, welche die Anheftung an den Vektor ermöglicht, besitzen Pollen anemophiler Pflanzen keinen Pollenkitt und werden schon bei geringer Luftbewegung davongetragen [67]. Weitverbreitete Gräser wie das Honiggras setzen von einer einzigen Blütendolde 2 bis 5 Millionen Pollen frei [67]. Die Birke emittiert pro Blütenstand ca. 5,4 Millionen Pollenkörner in die umgebende Atmosphäre [78]. Pollen windbestäubender Pflanzen besitzen einen Durchmesser zwischen 10 und 58  $\mu\text{m}$  [139] und werden bei Einatmung im Bereich der oberen Atemwege deponiert und können dort beim Allergiker die Symptome der allergischen Rhinitis auslösen. Aufgrund ihrer Größe dringen sie nicht tiefer als bis zur Trachea in den Respirationstrakt ein [67]. Zur Erklärung des allergischen Asthmas, dessen Symptome sich in den tiefen Lungenabschnitten, den terminalen Bronchioli, manifestieren, wird u.a. eine Freisetzung der allergenen Komponente aus den Pollen angenommen [126].

Pollenallergene sind vorwiegend im Pollen lokalisiert, nur in Einzelfällen konnte allergene Aktivität auf der Exine nachgewiesen werden. Es handelt sich um

Proteine oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 5 und 70 KD, welche wasserlöslich sind und bei Kontakt mit der menschlichen Schleimhaut meist innerhalb von Sekunden freigesetzt werden und diese penetrieren können [116]. Sie wirken als Antigene und besitzen die Fähigkeit eine IgE-vermittelte Immunantwort zu induzieren [24]. Bei den Gräsern gibt es über 6 Gruppen, von denen Gruppe 1 und 5 in bisher fast allen untersuchten Spezies gefunden werden konnten [5]. PETERSEN *et al.* [96] konnten zeigen, daß biochemische Merkmale wie Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt, Anfärbungsverhalten im Westernblot und NH<sub>2</sub>-terminale Aminosäurestruktur als Klassifikationskriterien keine eindeutige Einteilung gewährleisten und schlagen eine Allergenklassifikation nach der Struktur der IgE-reaktiven Epitope vor.

Identifizierte Allergene werden nach der Allergennomenklatur der Weltgesundheitsorganisation (WHO) benannt [136]. In *Tabelle 1.4-1* sind für einige Pollen die bereits klassifizierten Allergene dargestellt.

*Tabelle 1.4-1* Allergennomenklatur [111; 121; 136]

Pollen	Allergen	Funktion	Molekulargewicht
<i>Corylus avellana</i> (Hasel)	Cor a 1	Pathogenese-assoziiertes(PR-)Protein	17 KD
<i>Alnus glutinosa</i> (Erle)	Aln g 1	PR-Protein	17 KD
<i>Betula verrucosa</i> (Birke)	Bet v 1	PR-Protein	17 KD
	Bet v 2	Profilin	14 KD
	Bet v 3	Ca-bindendes Protein	24 KD
<i>Holcus lanatus</i> (Honiggras)	Hol l 1	unbekannt	34 KD
	Hol l 5	unbekannt	30 KD
<i>Artemisia vulgaris</i> (Beifuß)	Art v 1	unbekannt	47 KD
	Art v 2	unbekannt	20, 35 KD

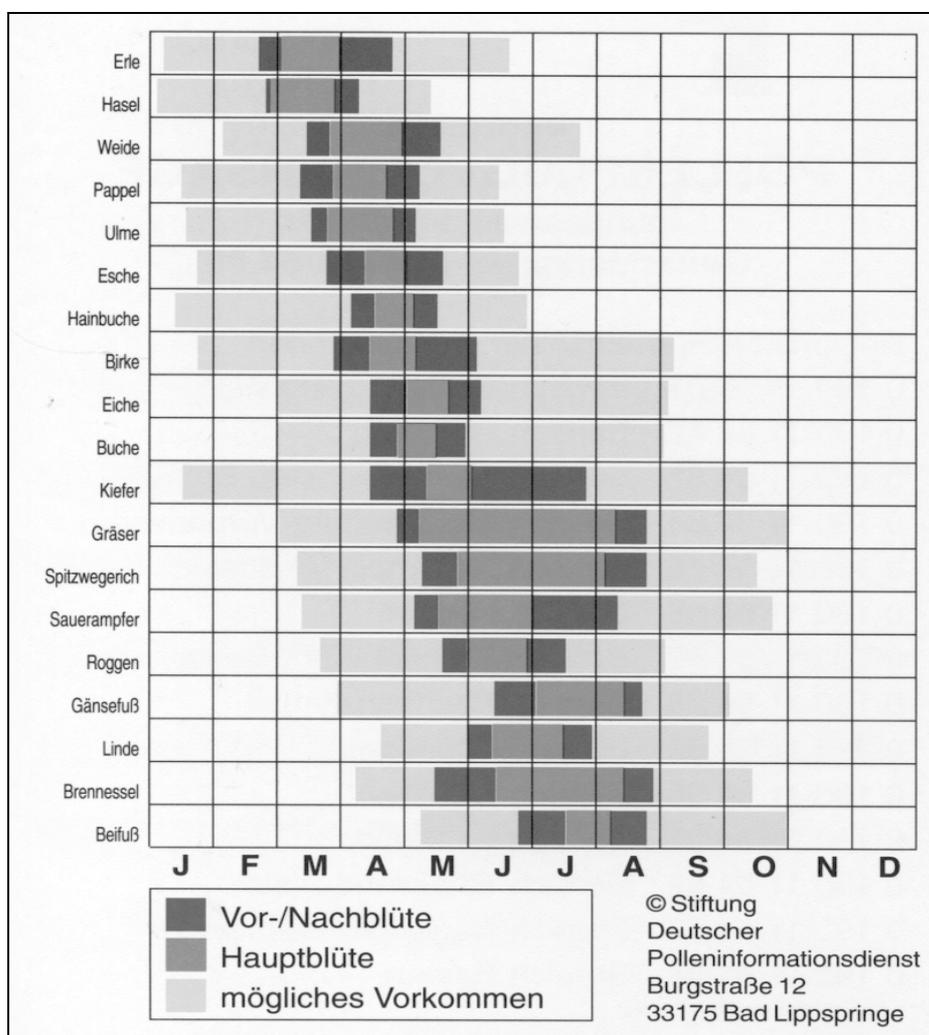
Mittels Sequenzanalyse lassen sich Rückschlüsse auf die biologische Funktion einzelner Allergene im Pollen ziehen, wobei diese für die meisten Pollenallergene bisher unbekannt ist [19]. Lange ist jedoch bekannt, daß Pollenallergene wichtige Aufgaben bei der Pollen-Stigma-Erkennung und bei eventuellen Inkompatibilitätsreaktionen wahrnehmen und funktionell an der Keimung des Pollens beteiligt sind [20; 52; 68]. Die unterschiedliche „allergene Potenz“ verschiedener Allergene ist derzeit auf molekularer Ebene noch nicht geklärt. Einige starke Allergene haben Enzymaktivität. Vorhersagen zur Allergenität einer Substanz aus ihrer molekularen Struktur allein sind noch nicht möglich [120; 121].

Reagieren über 50 % eines untersuchten Patientenkollektivs mit allergenspezifischen IgE-Antikörpern, bezeichnet man das diese Reaktion auslösende Allergen als Majorallergen. Reagieren weniger als die Hälfte der Patienten, wird das Allergen als Minorallergen klassifiziert [136].

#### 1.4.1 Aerobiologie von Pollen

Wichtiges Bindeglied zwischen der Allergieforschung und der Pollenkunde stellt die Aerobiologie dar, die sich mit der aerogenen Verbreitung von Pollen beschäftigt und somit Aussagen über die Allergenbelastung für den Pollinosispatienten möglich macht. Welche Pollen hauptsächlich für die Allergenbelastung in einer Region von Bedeutung sind, ist abhängig von der lokalen Flora. In Mitteleuropa stellen im Frühjahr Hasel, Erle und Birke, im Sommer die Gräserpollen und bis September der Beifuß die wichtigsten Allergenquellen dar [100]. Pollenflugkalender geben Auskunft über das aerogene Vorkommen von Pollen im Jahresverlauf [64]. Der Jahresgang ist abhängig von der Blütezeit der jeweiligen Pflanze, welche ihrerseits vom Klima der betreffenden Region abhängt. Dabei ist neben dem Klima zur Blütezeit auch die Vorjahreswitterung von Bedeutung, da beispielsweise bei Bäumen die Knospen bereits im Jahr zuvor angelegt werden [117]. In *Abbildung 1.4-1* sind exemplarisch die Pollenflugzeiten für einige windbestäubende Pflanzen für Deutschland gezeigt.

Abbildung 1.4-1 Gesamtdeutscher Pollenflugkalender (nach Pollenflugdaten von 1992 bis 1994) [123]



Neben den Schwankungen, die sich bei der Pollenzählung im Jahresverlauf zeigen, gibt es auch Schwankungen im Tagesverlauf, welche bei mehrfach täglicher (z.B. stündlicher) Zählung auffallen [87].

Diese tageszeitlichen Fluktuationen des Pollenfluges sind hauptsächlich abhängig von zwei Gruppen von Variablen: Einerseits denen, die Pollenentwicklung und -freisetzung beeinflussen, wie die meteorologischen Parameter Niederschlag, Lufttemperatur, Luftfeuchtigkeit, Sonnenschein und Wind, sowie andererseits von den physikalischen Variablen, die Pollentransport und -verbreitung steuern, wie Gravitation, Wind, Turbulenzen und Niederschlag [41].

Der Pollenflug selbst kann in drei Abschnitte unterteilt werden [118]:

1. Freisetzung und Dispersion (Emission)
2. Transport durch die Atmosphäre (Konvektion)
3. Niederschlag der Pollen (Sedimentation)

Jeder dieser Abschnitte kann durch Umweltfaktoren, wie die oben genannten Parameter einzeln, aber auch in komplexer Wechselwirkung beeinflusst werden.

#### **1.4.2 Beeinflussung des Pollenfluges durch natürliche Umweltfaktoren**

##### *Lufttemperatur*

Die Lufttemperatur hat einen indirekten Einfluß auf den Pollenflug: Sie wirkt auf die Freisetzung der Pollen aus dem Anther. Die Emissionstemperatur beträgt für Birkenpollen 15 Grad Celsius und für Gräserpollen 18 bis 20 Grad Celsius [85].

##### *Sonnenschein*

Die Dauer und Intensität der täglichen Sonnenbestrahlung hat nicht nur einen entscheidenden Einfluß auf Pflanzenwachstum und Pollenproduktion, sondern auch auf Emission und Transport im luftgetragenen Zustand. So wird eine signifikante positive Korrelation zwischen z.B. Gräserpollenzahl und Anzahl der täglichen Sonnenstunden registriert [44].

##### *Wind und Luftdruck*

Luftdruck, Windgeschwindigkeit und -richtung haben keinen Einfluß auf die Gräserpollenzahl [44; 87], wohl aber auf die Länge des Transportweges. Regelmäßig sedimentieren Pollen im Umkreis von einigen 100 Metern zu der Emissionsquelle [117]. Es wird aber auch von windabhängigen Transporten von Pollen über lange Strecken berichtet, die bis zu 18 Stunden andauerten und die allergische Symptome bei Atopikern aus Regionen auslösten, in denen der lokale Pollenflug erst Wochen später einsetzen sollte [53; 133].

## *Niederschlag*

Der Einfluß des Niederschlages auf den Pollenflug ist komplex [15]. In der Mehrzahl der Arbeiten, in denen meteorologische Einflußgrößen auf ihre Bedeutung auf den Pollenflug untersucht wurden, konnte eine negative Korrelation zwischen Niederschlag und Pollenzahl gefunden werden [44].

## *Relative Luftfeuchte*

Die Luftfeuchtigkeit ist von großer Bedeutung sowohl für die Pollenemission selbst als auch für die Freisetzung von Allergenen aus Pollen.

Bei geringer relativer Luftfeuchte schrumpfen die Antherenwände, platzen auf und setzen reife Pollenkörner aus dem Staubbeutel frei [117; 122]. So wurde von den meisten Arbeitsgruppen, die die Ergebnisse von Pollenzählungen auf ihren Zusammenhang mit meteorologischen Parametern untersuchten, für die Luftfeuchte einheitlich eine stark negative Korrelation angegeben [36; 44; 87]. LIEM *et al.* [77; 78] bezeichnen die relative Luftfeuchtigkeit sogar als den wichtigsten die Pollenfreisetzung beeinflussenden meteorologischen Faktor.

Auch in Arbeiten einer finnischen Gruppe [63; 94; 98], in denen neben Pollen auch allergenes Material von geringerer Größe als Pollen bei der Sammlung erfaßt wurde, konnte eine signifikant negative Korrelation zur relativen Luftfeuchtigkeit nachgewiesen werden. Das allergene Material in der Partikelgröße unter 2,4 µm ist nur mit speziellen Sammelgeräten nachweisbar und konnte sogar zu Zeiten, in denen kein Pollenflug bestand, gefunden werden. Da es bei Allergikern ebenso wie Pollen zu Symptomen führen kann, favorisieren die Autoren aufgrund der größeren Genauigkeit Allergenmessungen gegenüber Pollenzählungen.

Neben dem bereits beschriebenen Einfluß auf die Pollenfreisetzung aus dem Anther, hat die Luftfeuchtigkeit auch unmittelbare Effekte auf das einzelne Pollenkorn. Diese Effekte wurden am Pollen unter *in vitro*-Bedingungen von verschiedenen Gruppen untersucht:

HESLOP-HARRISON [52] untersuchte die Hydrodynamik von Pollen und bezeichnet den Vorgang der Rehydration als essentielle Voraussetzung für die

Keimung von Pollenkörnern. Der Prozeß der Rehydratation der während Reifung und Transport ausgetrockneten Pollen beginnt unmittelbar nach dem Auftreffen auf das Stigma. Durch die Feuchtigkeitsaufnahme des Pollen kommt es zur Freisetzung von Proteinen, die möglicherweise Funktionen bei der Pollen-Stigma-Erkennung wahrnehmen. Proteine, die im Bereich der Exine lokalisiert sind, werden innerhalb von Sekunden von der gesamten Pollenoberfläche mit Ausnahme der Keimporen freigesetzt [52]. Wenige Minuten nach Hydratation werden Proteine der Intine freigesetzt, die jedoch nur im Bereich der Apertur austreten [49; 51; 56]. Es konnte gezeigt werden, daß die zuerst freigesetzten Proteine aus dem Bereich der Exine Inkompatibilitätsreaktionen vermitteln [28; 29; 30; 50; 57; 66].

Desweiteren werden durch die Hydratation metabolische Prozesse im Pollen angestoßen, die schließlich zur Keimung führen. Dabei steht die Intensität der metabolischen Aktivität des Pollen im Verhältnis zur relativen Luftfeuchte. Hohe relative Luftfeuchte steigert die Respirationsrate und den Metabolismus des Pollen, reduziert gleichzeitig aber auch seine Vitalität. Dieses Phänomen ist bei trinukleären Pollen ausgeprägter als bei binukleären. Niedrige relative Luftfeuchtigkeit bremst den Metabolismus und verlängert die Lebensdauer sowohl bei bi-, als auch bei trinukleären Pollen. Bemerkenswerterweise reagieren Gräserpollen besonders empfindlich auf Schwankungen der Luftfeuchte und zeigen eine Reduktion von Metabolismus und Vitalität bei niedrigen Feuchtwerten [54, 55]. Nahm der Pollenwassergehalt von 60 % bis auf 10 % des Trockengewichtes ab, so reduzierte sich die *in vitro*- und *in vivo*-Keimungsfähigkeit sowie die metabolische Aktivität, welche anhand von Nukleotidmessungen quantifiziert wurde [101].

Neben Stoffwechselaktivierung und der Initiierung der Keimung hat die relative Luftfeuchte auch einen Einfluß auf die Pollenwand: So nehmen hydrierte Pollen im Keimungsmedium um ein Drittel mehr an Volumen zu als trockene Pollen, ein Effekt der von GILISSEN [43] mit einer Alteration der Zellwand in Abhängigkeit vom jeweiligen Hydrationszustand erklärt wird. Auch mit dem Transmissions-elektronenmikroskop konnten Veränderungen der Pollenoberfläche nach Hydratation trockener Pollen beobachtet werden [35].

## 2. Zielsetzung

Allergenbelastung und die Intensität allergischer Reaktionen stehen eng miteinander in Relation. Epidemiologische und experimentelle Studien weisen auf einen Zusammenhang atmosphärisch meßbarer Pollenallergenkonzentrationen und meteorologischer Faktoren hin, wobei die Luftfeuchtigkeit als wichtigster Parameter betrachtet wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Protein- und Allergenfreisetzung aus den für Allergiker relevanten Pollen von Hasel, Erle, Birke, Honiggras und Beifuß nach Exposition bei verschiedenen Luftfechtigkeiten am *in vitro*-Modell untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte angesichts der epidemiologisch feststellbaren, weltweit zunehmenden Prävalenz allergischer Erkrankungen der Einfluß des Luftschadstoffes Schwefeldioxid auf Honiggraspollen mittels *in vitro*-Exposition und anschließender immunbiochemischer Aufarbeitung nachvollzogen werden.

Ziel der Untersuchung war es somit, nach dem Konzept der Allergotoxikologie, ausgehend von epidemiologischen Daten, mit einem experimentellen Versuchsansatz einen möglichen Zusammenhang zwischen Umweltfaktoren und Allergieerkrankungen zu prüfen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Pollen

Die Untersuchungen wurden mit Pollen anemophiler Pflanzen durchgeführt, die eine hohe allergologische Relevanz besitzen und kommerziell erhältlich waren (Tabelle 3.1-1).

Tabelle 3.1-1 Übersicht über die untersuchten Pollen [60; 91]

Name		Durchmesser	Zahl der Keimporen	Bezugsquelle
deutsch	lateinisch			
Hasel	<i>Corylus avellana</i> L.	20-28 µm	triporat	Allergon, Uppsala/S
Erle	<i>Alnus incana</i> (L.)Moench.	19-29 µm	5(4)kolporat	Sigma, Deisenhofen/D
Birke	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	19-27 µm	triporat	Allergon, Uppsala/S
Honiggras	<i>Holcus lanatus</i> L.	20-30 µm	monoporat	ARTU, Lelystad/NL
Beifuß	<i>Artemisia vulgaris</i> L.	18-23 µm	trikolporat	Allergon, Uppsala/S

Diese Pflanzen gehören zu den Spermatophyta, der Unterabteilung der Angiospermae und hier zu den Bedecktsamern [34].

Hasel, Erle und Birke sind eine Unterklasse der Hamamelididae, Ordnung Fagales, und werden den Corylaceae (Hasel) bzw. Betulaceae (Erle und Birke) zugeordnet. Betulaceae und Corylaceae sind einhäusige Baumgewächse, welche weibliche und männliche Blüten auf derselben Pflanze tragen und zwei Fruchtblätter besitzen.

Haselsträucher sind in Wäldern und Gebüschern im größten Teil Europas sehr weit verbreitet und bevorzugen dabei fruchtbare Böden.

Auch Erlen sind in Europa ubiquitär verbreitet und besonders häufig auf feuchten Böden zu finden; dabei dominiert die Grauerle den Baumbestand in den Hochlagen der Gebirge.

Birken findet man häufig in trockenen Wäldern sowie auf Sandböden und Mooren. In den Wäldern Nordeuropas ist sie der vorherrschende Baum.

Das Honiggras gehört zu den bedecktsamigen, einkeimblättrigen Pflanzen und wird hier der Familie der Gramineae zugerechnet. Es ist eine dauerhafte und anpassungsfähige Pflanze, die auf Wiesen, Brachland, Mooren und an Waldrändern wächst. Das Honiggras kommt weltweit vor und ist in Europa ubiquitär.

Zur Unterklasse der Asteridae und zur Ordnung der Compositae, den Korbblütlern, gehört der Beifuß, der ebenfalls weit verbreitet ist und insbesondere an Wegrändern und auf Brachland zu finden ist [34]. Besonders häufig wächst er neben großen Durchfahrtsstraßen im städtischen Bereich und an Bahngleisen, nachdem die Unkrautvernichtung mit chemischen Mitteln verboten worden ist.

### 3.1.2 Gase

Die Expositionsanlage wurde mit synthetischer Luft der Firma Messer Griesheim, Krefeld, gefahren.

Als Schadgas wurde Schwefeldioxid eingesetzt, welches als Prüfgas mit Zertifikat von der Firma Messer Griesheim, Krefeld, bezogen wurde [83].

Schwefeldioxid wird bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe wie Kohle und Öl in großen Mengen emittiert und kann in der Luft über weite Strecken transportiert werden. Schwefeldioxid oxidiert mit Wasserdampf zu schwefliger Säure und kann sich als Rainout oder Washout niederschlagen [17].

Die WHO-Empfehlungen zum Schutz menschlicher Gesundheit liegen für  $\text{SO}_2$  bei  $50 \mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$  als arithmetischer Jahresmittelwert und bei  $125 \mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$  als 24-Stunden-Mittelwert [135]. Nach Daten der US Environmental Protection Agency lagen 1980 die 24-Stunden-Werte messbarer  $\text{SO}_2$ -Konzentrationen zwischen 0,001 ppm ( $2,26 \mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$ ) und 0,1 ppm ( $226 \mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$ ), wobei 0,1 ppm mit einer Häufigkeit von 50 % erreicht wurden [17].

Für Deutschland wurde als maximale Arbeitsplatz-Konzentration (MAK-Wert) für Schwefeldioxid eine Konzentration von 0,5 ppm oder  $1,3 \text{ mg SO}_2/\text{m}^3$  festgelegt [31].

### 3.1.3 Monoklonale Antikörper und Patientensera

Zum Nachweis der Majorallergene des Honiggrases kamen die monoklonalen Antikörper IG12 (markiert HOL I 1) und Bo1 (markiert Hol I 5) zur Anwendung [4]. Die monoklonalen Antikörper wurden von der Arbeitsgruppe „Allergie“ des Forschungszentrums Borstel nach der Methode von Goding entwickelt [45] und freundlicherweise von Dr. W.-M. Becker, Borstel, zur Verfügung gestellt.

Der Nachweis von Allergenen der Hasel, Erle und Birke sowie des Beifuß erfolgte mittels Seren, die von Allergikern gewonnen wurden, bei denen allergenspezifische Reaktivitäten von Klasse 4 oder höher im Pharmacia CAP RAST FEIA-System (Pharmacia, Uppsala, Schweden) feststellbar waren. Die Seren wurden von freiwilligen Spendern gewonnen.

### 3.1.4 Geräteliste

#### Pollenexpositionsanlage

Gasflußregler Steuereinheit	Model 247C; Fa. MKS, München
Gasflußregler Meßeinheit	Typ 1259CC; Fa. MKS, München
Kühlwasserbad	K20; Fa. Haake, Karlsruhe
Hygrometer	P570; Fa. Dostmann electronic, Wertheim

#### Geräte

Trockenschrank	Tv 10, Fa. Memmert
Vertikaler Drehmischer	Rotator N; Fa. TAAB
Zentrifugen	Biofuge 13 und Megafuge 1.0R; Fa. Heraeus, Hanau
Spektralphotometer	DU 640; Fa. Beckman, Fullerton, USA
pH Meter	pH 537; Fa. WTW, Weilheim
Feinwaage	MC1Research; Fa. Sartorius, Göttingen
Waage	MC1Labor; Fa. Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Typ 1003; Fa. GFL, Burgwedel

Kippschüttler	Typ 3012; Fa. GFL, Burgwedel;
Elektrophoresekammern	ProtResolv Maxi und ProtResolv Mini LC; Fa. Phase, Lübeck
SemiDry-Blottingkammer	Pegasus; Fa. Phase, Lübeck
Netzgerät	LNG 350-06; Fa. Heinzinger, Rosenheim
Pipetten	Reference; Fa. Eppendorf, Hamburg

### Mikroskope

Lichtmikroskope	Bio Med und Aristoplan; Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Kamera	WILD MPS 52; Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Rasterelektronenmikroskop	SEM 501; Fa. Philips, Kassel
Sputteranlage	SputterCoater SCD 050; Fa. Bal-Tec

### **3.1.5 Chemikalien und Materialien**

Acrylamid	Bio-Rad/München; Best.-Nr.161-0101
Alkalische Phosphatase konjugierte Maus-anti-human-IgE-mAb	Dianova/Hamburg
Alkalische Phosphatase konjugierte Ziege-anti-Maus-IgG+IgM-mAb	Dianova/Hamburg
Albumin Standard	Pierce/Rockford, Illin., USA; Best.-Nr. 23209
6-Aminohexansäure	Merck/Darmstadt; Best.-Nr. 8.00145.1000
Ammoniumpersulfat	Biorad/München; Best.-Nr. 161-0700
AuroDye	Amersham/Little Chalfout, England; Best.-Nr. RPN 490
5-Bromo-4-Chloro-3-Inolyl-Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich/Deisenhofen; Best.-Nr. B 0274
BIS	Bio-Rad/München; Best.-Nr. 161-0201
Bromphenolblau	Merck/Darmstadt; Best.-Nr. 0.08122.0005
Butanol	Merck/Darmstadt; Best.-Nr. 1.01990.2500

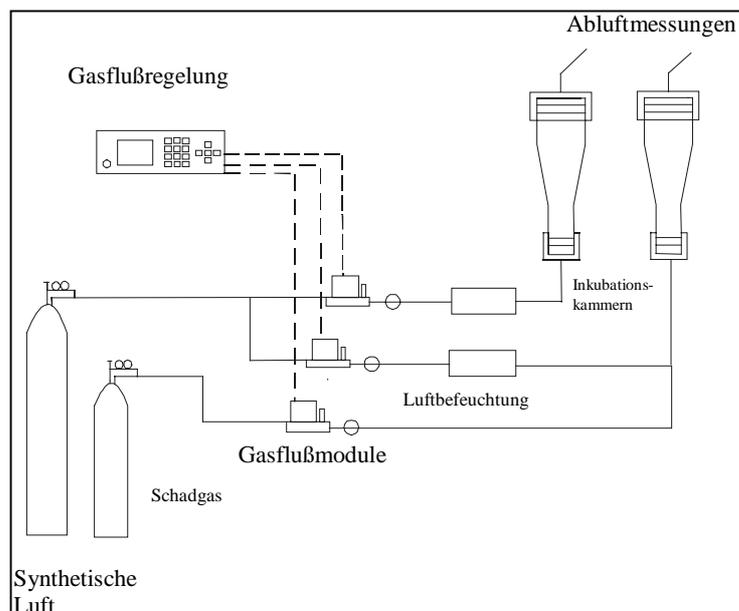
Coomassie Proteinbestimmungs-Reagenz	Pierce/Rockford, Illin., USA; Best.-Nr. 23200
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad/München; Best.-Nr. 161-0400
EDTA Titriplex III	Merck/Darmstadt; Best.-Nr. 1.08418.1000
Glycin	Merck/Darmstadt; Best.-Nr. 1.04201.1000
p-Nitrotetrazolium Blau Grade III (NBT)	Sigma-Aldrich/Deisenhofen; Best.-Nr. N-6876
India Ink	Calligraphy Ink; Pelican/Hannover
Pyronin Y	Serva/Heidelberg; Best.-Nr. 34075
Sodium-dodecylsulfat-Polyacrylamid	Bio-Rad/München; Best.-Nr. 161-0301
SDS-PAGE Standards low range	Bio-Rad/München; Best.-Nr. 161-0304
SDS-PAGE Standards high range	Bio-Rad/München; Best.-Nr. 161-0303
prestained SDS-PAGE Standards low range	Bio-Rad/München; Best.-Nr. 161-0305
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamine (TEMED)	Biomol/Hamburg; Best.-Nr. 50406
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Merck/Darmstadt; Best.-Nr. 1.08382.0500
Tween 20	Merck/Darmstadt; Best.-Nr. 822184
GEL Blotting Papier	Schleicher & Schüll/Dassel; Best.-Nr.426881
Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	Schleicher und Schüll/Dassel
Reaktionsgefäße 3810 (1,5 ml)	Eppendorf/Hamburg
Sterilfilter GV 0,22 µm	Millipore/Eschborn

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Pollenexpositionsversuche

Um Pollen unter *in vitro*-Bedingungen auf ihr Verhalten gegenüber einzelnen Umweltfaktoren untersuchen zu können, war eine geeignete Expositionsanlage erforderlich, in welcher Pollen unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen über einen, der natürlichen Pollenflugdauer entsprechenden Zeitraum von mehreren Stunden exponiert werden konnten.

Die Pollenexpositionsanlage ist in *Abbildung 3.2-1* schematisch dargestellt.



*Abbildung 3.2-1* Pollenexpositionsanlage [39]

Die wesentlichen Merkmale der verwandten Expositionsanlage waren:

- gleichmäßiger Kontakt aller Pollenkörner zum Trägergas / Schadgas
- die Regulierbarkeit der relativen Luftfeuchte
- genaue Einstellbarkeit der Schadgaskonzentration
- die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen

### *Relative Luftfeuchte*

Zur Erzeugung einer Atmosphäre mit konstanter relativer Luftfeuchte wurde die die Expositions-kammer durchströmende synthetische Luft vor dem Eintritt in die Kammer in eine mit *Aqua bidest.* gefüllte Gaswaschflasche geleitet und dort auf nahezu 100 % relative Feuchte gebracht. Eine zweite, mit synthetischer Luft gefüllte Gaswaschflasche befand sich in einem Kühlwasserbad. Durch diese wurde die synthetische Luft mit jetzt nahezu 100 % rF geleitet und in ihr ein Teil der Luftfeuchte in Abhängigkeit von der Kühlwassertemperatur wieder auskondensiert. Die Temperatur des Kühlwassers bestimmt somit die absolute Luftfeuchte, aus der sich die relative Luftfeuchte anhand der bei gegebener Außentemperatur bestehenden maximalen Aufnahmekapazität berechnen lässt [37]. Mit diesem Verfahren der Dampfdrucksättigungsmethode lassen sich Werte von 30 bis 80 % rF einstellen und konstant über mehrere Stunden halten. Um Pollen bei 0 % relativer Feuchte zu exponieren, wurde die synthetische Luft direkt in die Reaktionskammern eingeleitet. Die kontinuierliche Messung der relativen Feuchte erfolgte hygrometrisch im Abluftstutzen direkt über der Expositions-kammer (vgl. *Abbildung 3.2-1*).

Bei Versuchen, bei denen die Pollen gegenüber SO<sub>2</sub> exponiert wurden, wurde das Schadgas dem Trägergas (synthetische Luft) erst nach der Einstellung der Luftfeuchte beigemischt, um Verluste des Schadgases durch eine Reaktion mit *Aqua bidest.* zu verhindern.

### *Pollenexpositionsanlage*

Um eine gleichmäßige Exposition von Partikeln in der Größenordnung von Pollen (15-30 µm, vgl. *Tabelle 3.1-1*) zu erzielen, reicht es nicht aus, sie unbewegt dem Gasstrom auszusetzen, da sonst nur für die in der äußersten Schicht liegenden Pollenkörner ein direkter Kontakt zum Gas besteht. Um einen optimalen Gas-Pollen-Kontakt sicherzustellen, ist es vielmehr notwendig, die Pollen in ständiger Bewegung zu halten.

Zur Realisation dieser Forderung wurde die Expositions-kammer nach dem Bauprinzip eines Gas-Feststoff-Wirbelschichtreaktors konstruiert [40; 86].

Bei diesem Reaktortyp befinden sich die zu exponierenden Partikel in einer Reaktionskammer, die an Ober- und Unterseite mit einer semipermeablen Membran verschlossen ist, die das Gas hindurchströmen, die Partikel jedoch nicht passieren läßt. Die Membran ist in einem Zylinder aus Edelstahl fixiert, welcher Kopf- und Fußteil der Kammer bildet. Aufgrund des Reaktordesigns werden die sich in der Kammer befindenden Partikel durch den steten Gasstrom in Bewegung versetzt und gleichmäßig verwirbelt. Dabei bildete sich im unteren Teil der Kammer ein sogenanntes Fließbett aus, in welchem für alle Pollen ein optimaler Kontakt zum Gas besteht. Die Seitenwände der Kammer werden durch einen aus Saphierglas gezogenen Kolben gebildet, der sich in den oberen zwei Dritteln konisch erweitert. Dadurch nimmt im oberen Teil der Kammer die Geschwindigkeit des Gasflusses entsprechend der Querschnittszunahme des Kolbens ab.

Durch die verminderte Flußgeschwindigkeit sinken Pollenkörner, die das untere Fließbett mit dem Gasfluß verlassen haben, wieder ab und werden erneut in die Wirbelschicht integriert.

Nach GELDART [42] werden Partikel aufgrund ihres Verhaltens im Gasfluß des Wirbelschichtreaktors in vier Gruppen eingeteilt. Pollen befinden sich dabei in Partikelgruppe C (Dichte etwa  $1 \text{ g/cm}^3$ , Durchmesser unter  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , Vorhandensein kohäsiver Eigenschaften). Für Partikel dieser Gruppe ist die Ausbildung eines Fließbettes im Gas-Feststoff-Wirbelschichtreaktor nur möglich, wenn ein mechanischer Impuls die Bildung von Partikelaggregaten verhindert. Zu diesem Zweck besitzt die Expositionsanlage einen elektromagnetischen Impulsgeber, der eine, über ein Zeitschaltrelais steuerbare, diskontinuierliche, mechanische Erschütterung auf die Expositions-kammer überträgt.

### *Gasflußregulation*

Der Gasfluß wurde über einen Gasflußregler (Firma MKS, München) kontrolliert, der aus einer Steuereinheit und drei Meßeinheiten bestand und es ermöglichte, zwei Expositionskammern parallel zu betreiben.

Die Einstellung der gewünschten Schadgaskonzentration erfolgte über Beimischung zu der als Trägergas wirkenden synthetischen Luft über einen gesonderten Kanal.

Um eine Reaktion des Schadgases mit dem der Luftbefeuchtung dienenden *Aqua bidest.* zu verhindern, wurde sie distal von der Einstellung der Luftfeuchte eingeleitet.

### *Expositionsablauf*

Jeweils 1 g Pollen wurden nach Äquilibration an die Raumtemperatur in die Expositionskammer eingefüllt. Unmittelbar danach folgte die erste Probenentnahme (drei Entnahmen von je 20 mg Pollen) mit einem Löffel aus der Kammer, um über Ausgangswerte zu verfügen. Die so gewonnenen Pollen wurden direkt der weiteren, unten beschriebenen Aufarbeitung (vgl. Abschnitt 3.2.2.) zugeführt. Anschließend wurde die Expositionskammer verschlossen und der Gasfluß eingestellt. Durch die beiden Gaswaschflaschen und das Kühlwasserbad wurde die relative Luftfeuchte bereits vor Versuchsbeginn auf den gewünschten Wert gebracht und konstant gehalten.

Durch den steten Gasfluß und die mechanische Erschütterung durch den Impulsgeber konnte ein Fließbett aufgebaut werden. Der Gasfluß lag je nach Pollenart in Abhängigkeit vom jeweiligen aerodynamischen Verhalten zwischen 800 und 1000 ml pro Minute, die Taktfrequenz des Impulsgebers zwischen 0,2 und 2 Impulsen pro Sekunde.

Zusätzlich zur Probeentnahme vor Beginn der Exposition ( $t_0$ ) wurden Proben zu vier weiteren Zeitpunkten entnommen: nach 1,5 Stunden ( $t_1$ ), nach 3 Stunden ( $t_2$ ), nach 6 Stunden ( $t_3$ ) und nach 9 Stunden ( $t_4$ ) Expositionsdauer.

Die Proben wurden zu allen Entnahmezeitpunkten als Triplets gewonnen und wie folgt aufgearbeitet:

Direkt nach der Probengewinnung erfolgte die Protein- und Allergenextraktion in *Aqua bidest.* und in Ammoniumcarbonatpuffer pH 8.

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Extrakte wurde unmittelbar danach anhand der Methode nach BRADFORD [125] am Photometer Beckmann DU 640 bei 595 nm vorgenommen (vgl. Abschnitt 3.2.2).

Nach Aliquotierung wurden die Proben bei -25°C gelagert und später den weiteren immunbiochemischen Untersuchungen zugeführt.

Von jeder Probe wurden Präparate hergestellt und lichtmikroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Nach Abschluß der Expositionszeit wurden weitere Pollen zur Bestimmung des Trockengewichtes entnommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 36 Pollenexpositionversuche mit den Arten Hasel, Erle, Birke, wolliges Honiggras und Beifuß durchgeführt.

Alle genannten Pollenarten wurden sowohl mit reiner synthetischer Luft als auch bei relativen Luftfeuchten von 30, 40, 50, 60, 70 und 80 % rF exponiert. Die Pollen des wolligen Honiggrases wurden darüber hinaus auch gegenüber Schwefeldioxid in Konzentrationen von 20 bis 13100 µg SO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> exponiert.

### **3.2.2 Extraktion der Proteine und Allergene**

Zur Protein- und Allergenextraktion wurden eingesetzt:

1. *Aqua bidest.*
2. Ammoniumcarbonatpuffer (0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Puffer bei pH 8)

*Aqua bidest.* wurde gewählt, da es unter *in vitro*-Bedingungen als Modell für die natürliche Wechselwirkung von Pollen mit Regenwasser geeignet ist.

Ammoniumcarbonatpuffer (AC-Puffer) wird seit vielen Jahren als Extraktionsmedium zur Herstellung von Allergenextrakten in der Allergologie eingesetzt [122].

Da der pH-Wert bei der Protein- und Allergenextraktion eine entscheidende Rolle spielt, wurde er im AC-Puffer konstant mit gasförmigem CO<sub>2</sub> auf pH 8 eingestellt [22].

Nach Entnahme der 20 mg umfassenden Pollenprobe aus der Expositionskammer wurde diese in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:20 mit dem jeweiligen Extraktionsmedium versetzt. Die Extraktion erfolgte auf einem vertikalen Drehmischer (Rotator N, Firma TAAB) bei 2 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten. Die anschließende Zentrifugation der Proben wurde in einer Heraeus Biofuge 13 bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 30 min durchgeführt. Danach wurden die Überstände abpipettiert und in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Ein Teil der Proben wurde sterilfiltriert (Sterilfilter GV 0,22 µm, Firma Millipore, Eschborn). Alle Überstände wurden photometrisch auf ihren Proteingehalt untersucht. Die Pellets wurden bei -25°C gelagert.

Bevor mit den Hauptversuchen begonnen werden konnte, wurde für jede der in dieser Arbeit untersuchten Pollenart in Vorversuchen der Zeitverlauf der Proteinfreisetzung aus den Pollen ermittelt. Zu diesem Zweck wurden native Pollen zu jeweils 20 mg in Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert und im folgenden im Verhältnis 1:20 in den Extraktionsmedien *Aqua bidest.* oder AC-Puffer suspendiert.

Die Extraktion der Pollen erfolgte auf dem Drehmischer. Um Rückschlüsse auf die Kinetik der Proteinfreisetzung ziehen zu können, wurden 3, 6, 9, 12, 15, 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten extrahiert. Nach der Extraktion wurden die Pollen wie oben beschrieben zentrifugiert und der jeweilige Proteingehalt mit dem Photometer bestimmt. Es zeigte sich, daß 30 Minuten für eine Extraktion ausreichten.

### *Trockengewichtsbestimmung*

Bei Exposition in verschiedenen Luftfeuchten ist zu erwarten, daß die Pollen unterschiedlich stark mit Flüssigkeit beladen werden und sich daher in ihrem spezifischen Gewicht unterscheiden: Die Pollen nehmen aufgrund ihrer hygrokopischen Eigenschaften Feuchtigkeit in Abhängigkeit zur relativen Luftfeuchte ihrer unmittelbaren Umgebung auf. Diese feuchtigkeitsbedingte Gewichtszunahme ist bei Pollen, welche bei hoher relativer Luftfeuchte exponiert wurden, stärker ausgeprägt als bei niedrigen Luftfeuchtwerten und kann dazu führen, daß bei konstanter Einwaage bei der Extraktion eine zu geringe Pollenmenge eingesetzt wird, welche in einer falsch niedrigen Protein- und Allergenfreisetzung resultiert.

Um trotz dieses Effektes die Proteinfreisetzung aus Pollen vergleichen zu können war es notwendig, zu ermitteln, wieviel Feuchtigkeit Pollen der jeweiligen Art pro Prozent relativer Expositionsfeuchte aufnehmen.

Da in der Literatur nur sehr wenige Angaben zu dieser Fragestellung zu finden waren [18], mußten diese Daten zunächst experimentell ermittelt werden. Zu diesem Zweck kam die aus der Lebensmittelchemie stammende Methode der Gewichtsbestimmung bis zur Gewichtskonstanz zum Einsatz: Es wurden etwa 200 mg Pollen nach 9 stündiger Exposition aus der Expositions-kammer entnommen und sofort in einem Aluminiumschälchen auf der Feinwaage bei Raumtemperatur und -luftfeuchte gewogen. Das Gewicht der Pollen wurde alle 30 Sekunden bestimmt. Nach spätestens 5 Minuten war das Gewicht konstant und die Pollen wurden in einen Trockenschrank überführt, in dem sie 24 Stunden bei 90°C getrocknet wurden.

Nach 24 Stunden erfolgte ein erneutes Wiegen der Pollen auf der Feinwaage in Intervallen von 30 Sekunden für 5 Minuten. Aus den so gewonnenen Daten konnte das Pollengewicht, welches sich bei mehrstündiger Exposition bei der jeweiligen Luftfeuchte einstellt, ermittelt und weiterhin die Feuchtigkeitsaufnahme der Pollen pro Prozent relativer Feuchte während der Exposition rechnerisch bestimmt werden.

### 3.2.3 Protein- und Allergenbestimmung

#### *Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der *Aqua bidest.*- und AC-Puffer-Extrakte erfolgte photometrisch bei 595 nm mit der Methode nach BRADFORD [125]. Dazu wurden 20 µl des Extraktes (bei Haselpollen aufgrund des niedrigeren Proteingehaltes 50 µl des Extraktes) mit 1000 µl der Coomassie Protein Assay Reagenz der Firma Pierce, Rockford, Illinois, USA, versetzt und in 3 Wiederholungen im Beckmann Spektralphotometer DU 640 gemessen. Als Leerwert kam *Aqua bidest.* entsprechend mit der Protein Reagenz versetzt zum Einsatz. Zur Kalibrierung des Photometers wurde eine Konzentrationsreihe aus der kommerziell erhältlichen Standard Protein Lösung (2 mg/ml BSA) der Firma Pierce erstellt.

#### *Gelelektrophoretische Auftrennung der Extrakte*

Zur genauen Charakterisierung der Proteine und Allergene wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI [76] eingesetzt. Dazu kamen Elektrophoresekammern der Firma Phase, Lübeck, zur Anwendung.

Vor der SDS-PAGE wurde der zu untersuchende Proteinextrakt zunächst in einem reduzierenden Probenpuffer, der das stark anionische SDS enthält, für 5 Minuten bei 95°C im Wasserbad erhitzt. Dadurch werden die Proteine denaturiert und an SDS gebunden, wodurch negativ geladene Mizellen entstehen. Im Sättigungszustand werden etwa 1,4 g SDS pro 1 g Protein gebunden.

Die Mizellen wandern nun proportional zum Molekulargewicht des Polypeptides durch die Poren des Gels, der angelegten elektrischen Spannung folgend zur Anode. Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht bewegen sich dabei schneller als solche mit höherem in Richtung des Elektronenflusses. Die eingesetzten Polyacrylamidgele bestanden aus einem Sammelgel mit großer Porengröße und einem Trenngel mit kleiner Porengröße. Hierdurch wird eine Sammlung der Proteine an der Trennschicht zwischen den Gelen erreicht und durch diesen

Konzentrationseffekt die Auftrennung der Proteine im Trenngel verbessert. Zur erhöhten Trennschärfe der Proteinbanden trug auch der Einsatz eines diskontinuierlichen Puffersystemes bei, bei dem der Elektrodenpuffer im oberen und unteren Reservoir der Elektrophoresekammer einen pH von 8,3, der Puffer im Sammelgel pH 6,8 und im Trenngel einen pH von 8,9 aufwies.

Die Gele wurden in einer Größe von 95x160 mm gegossen und enthielten eine Acrylamidkonzentration von 12 %. Im oberen Sammelgel wurden durch die Einlage von Teflonkämmen Fächer für die aufzutrennenden Proben vorbereitet.

Die Proben wurden in einer Konzentration von 5 µg Protein pro 1 cm Fächerbreite eingesetzt. Um das Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine beurteilen zu können, wurde ein Molekulargewichtsstandard (Typ Low der Firma BioRad, München) verwandt. Bis zum Erreichen der Trennschicht zwischen Sammelgel und Trenngel durch die Proben wurde die Elektrophorese bei 50 Volt, danach bei 100 Volt durchgeführt.

Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gellösung für 2 Gele:

Trenngel:	8	ml Acrylamidlösung
	2,5	ml Trenngelpuffer
	9,3	ml <i>Aqua bidest.</i>
	10	µl TEMED
	200	µl SDS 10 %
	200	µl APS 10 %

Sammelgel:	600	µl Acrylamidlösung
	750	µl Sammelgelpuffer
	4,56	ml <i>Aqua bidest.</i>
	3	µl TEMED
	60	µl SDS 10 %
	48	µl APS 10 %

Trenngelpuffer:	3	M Tris/ HCL (pH 8,9)
-----------------	---	----------------------

Sammelgelpuffer: 0,47 M Tris/ HCL (pH 6,7)

Acrylamidlösung: 30 g Acrylamid  
0,8 g Bisacrylamid  
ad 100 ml *Aqua bidest.*

Elektrodenpuffer: 3,0 g Tris  
14,4 g Glycin  
10 ml SDS 10 %  
5 ml EDTA 0,2 M  
ad 1000 ml *Aqua bidest.*

reduzierender Probenpuffer: 25 ml Sammelgelpuffer  
2,5 ml EDTA 0,2 M  
20 ml SDS 10 %  
28,6 ml Glycerin 87 %  
Bromphenolblau (nach Bedarf)  
ad 100 ml *Aqua bidest.*

### *Westernblot*

Um die in der SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine färbetechnisch nachweisen zu können, mußten sie zunächst auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Dazu wurde die Methode des Semi-Dry-Blotting nach KYHSE-ANDERSEN [65] eingesetzt. Die Nitrocellulosemembran (Porengröße von 0,45 µm) wurde zunächst wie das Gel vor dem Blotting-Vorgang für 30 Minuten in Anodenpuffer II äquillibriert.

In der Blottingkammer vom Typ Phase Semi-Dry-Blotter Pegasus wurden die einzelnen Komponenten wie folgt räumlich angeordnet:

1. Kathode
2. Zwei in Kathodenpuffer getränkte Blottingfilterpapiere
3. Polyacrylamidgel
4. Nitrocellulosemembran
5. Ein in Anodenpuffer II getränktes Blottingfilterpapier
6. Zwei in Anodenpuffer I getränkte Blottingfilterpapiere
7. Anode

Die einzelnen Lagen wurden luftblasenfrei aufeinandergeschichtet und mit einer Walze angerollt. Abschließend wurde die Kammer für die gesamte Dauer des Blotting-Vorgangs mit einem 3 kg-Gewicht beschwert.

Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  in 45 Minuten. Nach erfolgtem Blotting wurde die Nitrocellulosemembran für 30 Minuten in Tris AP-Puffer pH 7,4 Tween blockiert [3] und anschließend weiteren Nachweismethoden zugeführt.

Kathodenpuffer:                    25 mM Tris / HCL (pH 9,4)  
     10 % Methanol  
     40 mM Aminohexansäure

Anodenpuffer I:                    300 mM Tris / (pH 10,4)  
     20 % Methanol

Anodenpuffer II:                    25 mM Tris / HCL (pH 10,4)  
     20 % Methanol

*Proteinnachweis mit India Ink*

Die auf Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine wurden mittels Anfärbung mit India Ink (Firma Pelikan, Hannover) nach HANCOCK und TSANG [47] zur Darstellung gebracht.

Dazu wurde die noch feuchte Membran in 0,1 % India Ink in Tris AP-Puffer pH 7,4 Tween überführt und für 2-6 Stunden auf dem Kippschüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 3x30 Minuten in *Aqua bidest.* gewaschen, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu entfernen. Schließlich wurde die Membran auf einem Filterpapier lichtgeschützt getrocknet.

#### *Proteinnachweis mit AuroDye*

Mit der AuroDye-Färbelösung (Firma Amersham, Little Chalfout, England) besteht die Möglichkeit, Proteine, die mit India Ink nicht oder nur schwach markierbar sind, verstärkt anzufärben. Dazu wurde die Blottingmembran nach abgeschlossener India Ink-Färbung für etwa 20 Minuten in der AuroDye-Lösung inkubiert und zur Elimination der Hintergrundfärbung anschließend für 3x30 Minuten mit *Aqua bidest.* gewaschen.

#### *Allergennachweis mit monoklonalen Antikörpern*

Für den Allergennachweis in den aus Honiggraspollen gewonnenen Extrakten kamen die monoklonalen Antikörper (mAb) BO1 und IG12 zum Einsatz, die von Dr. W.-M. Becker, Borstel, zur Verfügung gestellt wurden.

Der mAb IG12 bindet an das Majorallergen Hol I 1 und der mAb BO1 an das Majorallergen Hol I 5 [110].

Die mAbs wurden in einer Verdünnung von 1:100 (mAb IG12) und 1:40 (mAb Bo1) in AP-T-Puffer als Primärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden monoklonale mit alkalischer Phosphatase konjugierte Ziege-anti-Maus IgG- und IgM-Antikörper (Dianova, Hamburg) verwandt.

#### *Allergennachweis mit humanem Serum*

Um die Allergene aus Extrakten der Pollen von Hasel, Erle, Birke und Beifuß immunologisch nachzuweisen, wurden Seren von Allergikern eingesetzt, die im CAP RAST FEIA-Testsystem (Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Schweden)

Reaktivitäten von Klasse 4 oder höher gegenüber den zu testenden Allergenen aufwiesen (Klasse 0=negativ; Klasse 6=sehr stark positiv). Diese Untersuchungen wurden im Allergenlabor der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg, durchgeführt, wo sie als Routinemethode in der Allergiediagnostik etabliert sind.

Als Sekundärantikörper wurden monoklonale mit alkalischer Phosphatase konjugierte Maus-anti-human IgE-Antikörper der Firma Dianova, Hamburg, eingesetzt.

Der Allergennachweis mit mAb und Patientensera erfolgte nach demselben Verfahren und unterschied sich lediglich durch den Einsatz unterschiedlicher Erst- und Zweitantikörper:

Die Nitrocellulosemembran wurde, nach abgeschlossenem Westernblotting und 30minütiger Blockierung in AP-T-Puffer, über Nacht in einer AP-T-Puffer Lösung mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Nach Waschen (3x10 min) in AP-T-Puffer erfolgte die 2-3stündige Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in einer AP-T-Puffer-Lösung. Nach erneutem Waschen (2x10 min in AP-Puffer pH 9,5 bei 37°C) erfolgte die Färbereaktion bei 37°C in NBT-Lösung, welche im Verhältnis 1:30 mit BCIP-Lösung versetzt wurde.

Die Reaktion wurde durch Waschen mit *Aqua bidest.* bei Raumtemperatur gestoppt und die Membranen lichtgeschützt auf einem Filterpapier getrocknet.

AP-Puffer pH 7,4	1 M Tris / HCl
(10fache Stammlsg.):	1 M NaCl
	25 mM MgCl <sub>2</sub>

AP-T-Puffer:	AP-Puffer pH 7,4 (10fach)
	mit <i>Aqua bidest.</i> 1:10 verdünnt
	ad 0,05 % Tween 20

AP-Puffer pH 9,5 (5 fache Stammlsg):	0,5 M Tris / HCl 0,5 M NaCl 25 mM MgCl <sub>2</sub> zum Gebrauch 1:5 mit <i>Aqua bidest.</i> verdünnt
BCIP-Lösung:	0,5 % 5-Brom-4-chlor-indolylphosphat- kaliumsalz in <i>Aqua bidest.</i> , (aliquotiert bei -25 °C aufbewahrt)
NBT-Lösung:	0,033 % Nitroblautetrazoliumchlorid in AP-Puffer pH 9,5 (bei +4°C lichtgeschützt aufbewahrt)

### 3.2.4 Mikroskopie

#### *Lichtmikroskopie*

Zur Herstellung der Präparate für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden etwa 10 mg Pollen aus der Expositionskammer entnommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Dort wurden sie mit Safranin in phenolischer Lösung hellrot angefärbt und in Gelatine auf Objektträgern mit Deckglas eingebettet. Diese Methode entspricht dem Routineverfahren, mit dem Präparate für die Pollenzählung angefertigt werden [26; 64].

24 Stunden später wurden die Präparate mit Nagellack versiegelt und mikroskopisch bei bis zu 400facher Vergrößerung auf morphologische Veränderungen von Binnenstruktur und Oberfläche hin untersucht.

Färbungs- und Einbettungslösung: 288 ml Glycerin  
166,5 ml *Aqua bidest.*  
35 g Gelatine  
10 g Phenol  
10 ml Safranin-Lösung (0,1 %).

### *Rasterelektronenmikroskopie*

Die Proben wurden nach Entnahme aus der Expositions-kammer auf mit selbstklebender Folie belegten Objekt-tellern durch Aufstäuben fixiert und in einem Exsikkator über Blaugel getrocknet. Anschließend erfolgte die Besputterung mit Gold in einer Sputteranlage vom Typ Bal-Tec SCD 050 SputterCoater.

Die Untersuchung der Pollenoberfläche erfolgte im Philips SEM 501 Rasterelektronenmikroskop bis zu einer 5000fachen Vergrößerung.

### **3.2.5** Statistische Methoden

Es wurden Korrelationskoeffizienten (Pearson) zur Beschreibung des Zusammenhanges zwischen relativer Luftfeuchte, bei der die Pollen exponiert wurden, und dem Proteingehalt der Extrakte bestimmt. Mit Hilfe des t-Testes wurde überprüft, ob dieser Korrelationskoeffizient von Null signifikant verschieden war. Ein Ergebnis wurde dann als signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 0,05 war.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Funktionsprüfung der Expositionsanlage

Um die Funktionstüchtigkeit der Pollenexpositionsanlage zu überprüfen, wurden Vorversuche durchgeführt.

Es wurde ermittelt, ob verschiedene Pollen, die sich aufgrund ihrer Oberflächenbeschaffenheit und Größe durch ein unterschiedliches aerodynamisches Verhalten auszeichnen, gleichermaßen für den Einsatz im Wirbelschichtreaktor geeignet waren. Für alle Pollen konnte nach Anpassung der Parameter "Gasfluß" und "Impulsgeberfrequenz" die Ausbildung einer suffizienten Wirbelschicht erzielt werden (*Tabelle 4.1-1*).

*Tabelle 4.1-1* Parameter für die Erzeugung einer Wirbelschicht für einige Pollenarten

Pollenart	Gasfluß	Impulsgeberfrequenz
Hasel	800 ml/min	0,2-1 Impuse/sec
Erle	800 ml/min	0,2 Impuse/sec
Birke	800 ml/min	1-2 Impuse/sec
Honiggras	1000 ml/min	0,2 Impuse/sec
Beifuß	1000 ml/min	0,2-2 Impuse/sec

Zur Einstellung einer konstanten relativen Luftfeuchte wurden ebenfalls Vorversuche durchgeführt. Hierzu wurde die Expositionsanlage ohne Pollen betrieben und der tatsächlich erreichte Luftfeuchtwert dann mit einem theoretisch ermittelten Wert verglichen.

In einem zweiten Schritt wurden dann die rF-Werte ohne Pollen mit denjenigen verglichen, die durch Zugabe von Pollen in die Kammer erzielt wurden.

Die tatsächlich erreichten Luftfeuchtwerte lagen durchschnittlich um ca. 10 % unter den theoretisch zu erwartenden Werten (*Abbildung 4.1-1*).

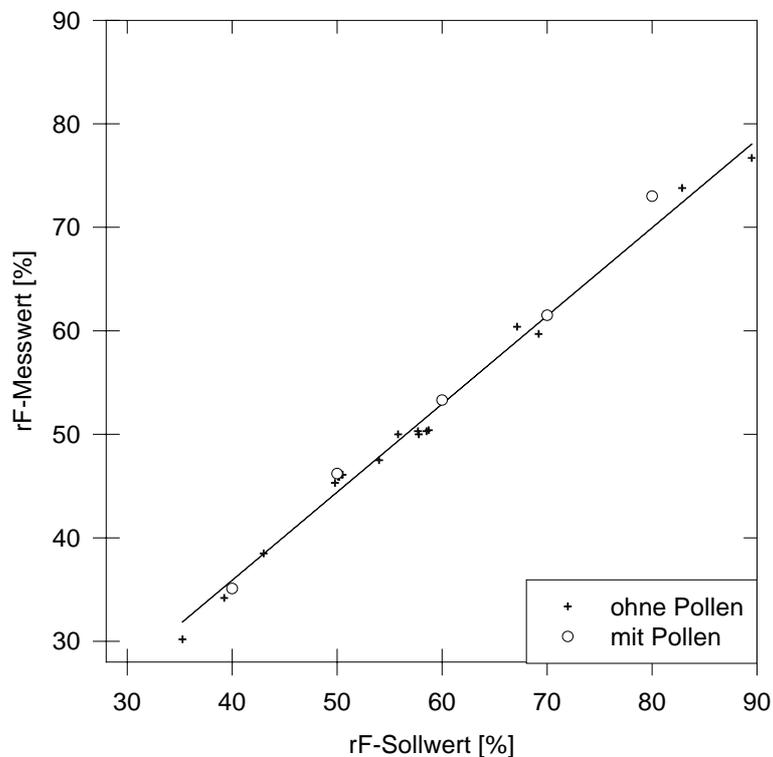


Abbildung 4.1-1 Einfluß der Zugabe von Pollen in die Pollenexpositionsanlage auf die Messung der relativen Luftfeuchte (rF)

#### 4.2 Verhalten von Pollen bei Exposition gegenüber synthetischer Luft (0 % rF)

Alle Pollenarten wurden zunächst für eine Dauer von 9 Stunden in der Expositionsanlage einem steten Fluß reiner synthetischer Luft (0 % rF) ausgesetzt und in der Wirbelschicht gehalten.

Proben der so vorbehandelten Pollen wurden vor und nach 1,5 Stunden, 3 Stunden, 6 Stunden und 9 Stunden Exposition aus der Anlage entnommen und licht- und rasterelektronenmikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht. Bei keiner der untersuchten Pollenarten zeigten sich unter diesen Versuchsbedingungen morphologisch faßbare Änderungen.

Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die mechanischen Einflüsse im Wirbelschichtreaktor, die unvermeidlich während der Exposition auf die Pollen wirken (z.B. Wandkontakte), zu keiner sichtbaren Schädigung der Pollenoberfläche führen.

Auch bei veränderten Versuchsbedingungen, wie etwa unterschiedlicher relativer Luftfeuchte oder Exposition mit Schadgasen, wie z.B. Schwefeldioxid, wurden keine morphologischen Veränderungen am Pollen gefunden.

Zur Charakterisierung des Pollenverhaltens unter reiner synthetischer Luft wurde die Proteinfreisetzung nach Extraktion mit *Aqua bidest.* bzw. AC-Puffer, pH 8, bestimmt (Abbildung 4.2-1).

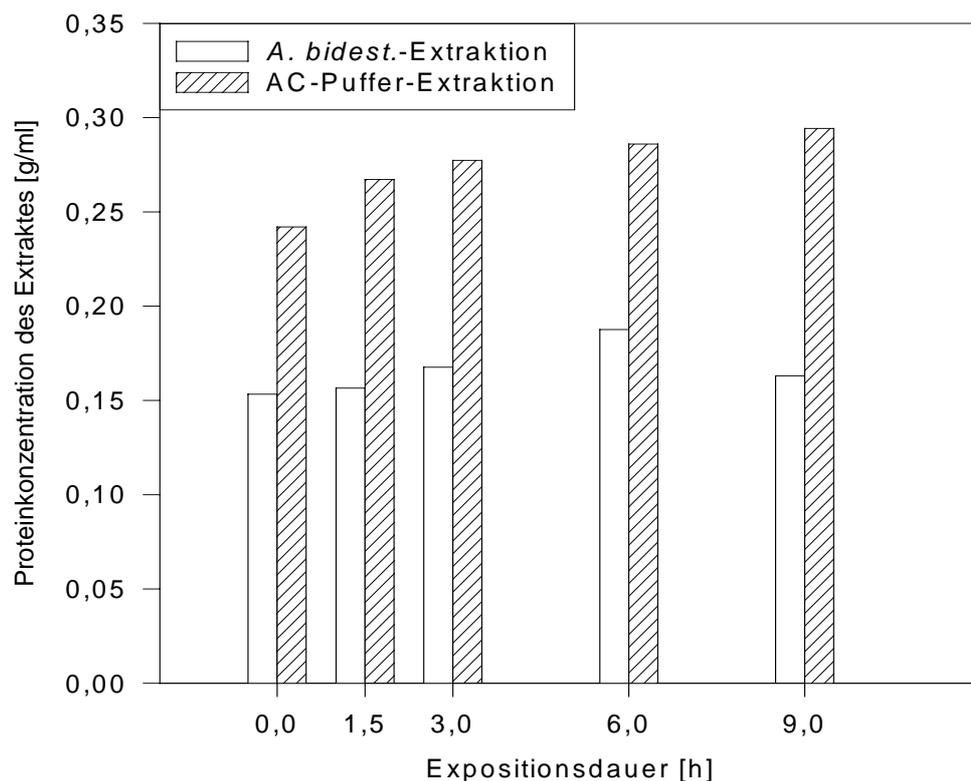


Abbildung 4.2-1 Absolute Proteinfreisetzung beispielhaft für Honiggraspollen (exponierte Pollenmenge 1 g; extrahierte Pollenmenge je 20 mg)

Die Proteinfreisetzung aus Honiggraspollen steigt danach sowohl nach Extraktion mit *Aqua bidest.*, als auch mit AC-Puffer, pH 8, zeitabhängig an. Bei den AC-Extrakten liegt die Proteinkonzentration mit 0,294 g/ml Extrakt deutlich über den mit *Aqua bidest.* erreichten Werten (max. 0,167 g/ml). Auch die Zunahme der extrahierbaren Menge Protein ist in den ersten 3 Stunden des Expositionsverlaufs bei AC-Extrakten stärker ausgeprägt als bei *Aqua bidest.*-Extrakten, bei denen der Anstieg langsamer erfolgt und bereits nach 6 Stunden ein Maximum erreicht.

Um eine geeignete Zeitdauer für die Extraktion von Proteinen aus Pollen festlegen zu können, war es zunächst notwendig, die Kinetik der Proteinfreisetzung an nicht-exponierten Pollen zu untersuchen.

Die *Abbildungen 4.2-2 bis 4.2-6* zeigen die Proteinfreisetzung aus Hasel-, Erlen-, Birken-, Honiggras- und Beifußpollen im Verhältnis zur Extraktionsdauer im jeweiligen Medium.

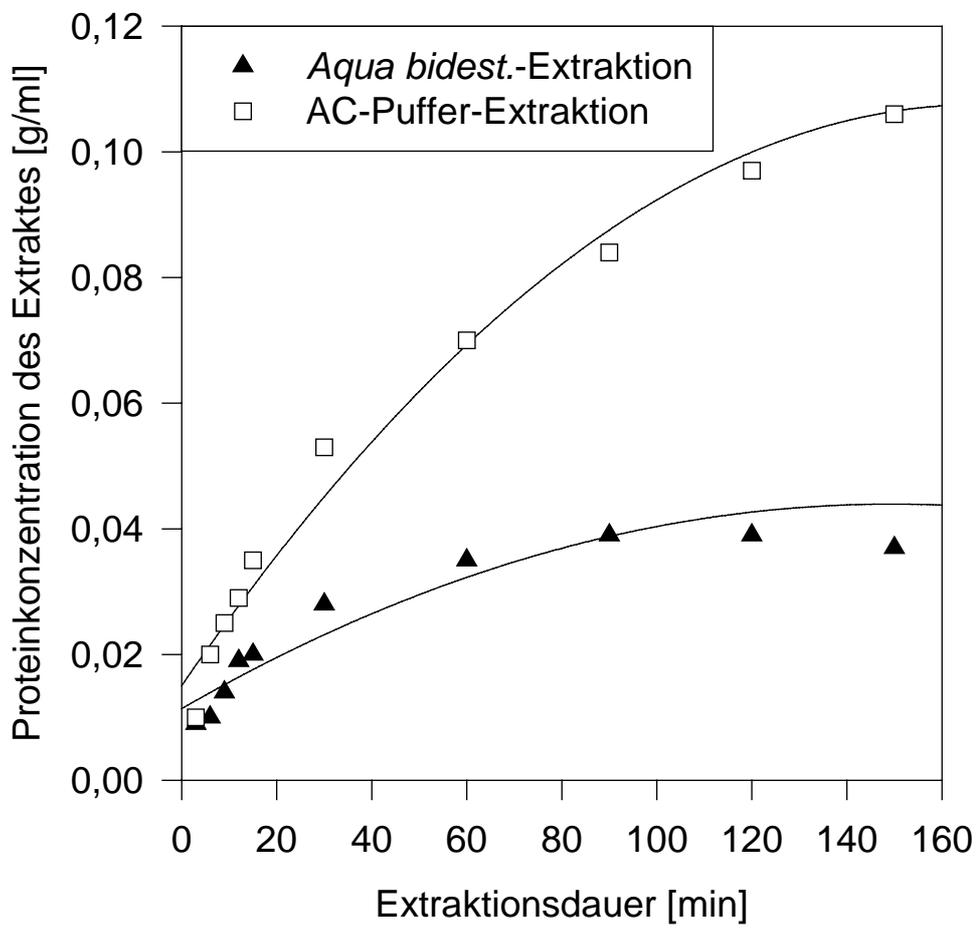


Abbildung 4.2.-2 Proteingehalt von Haselpollenextrakten

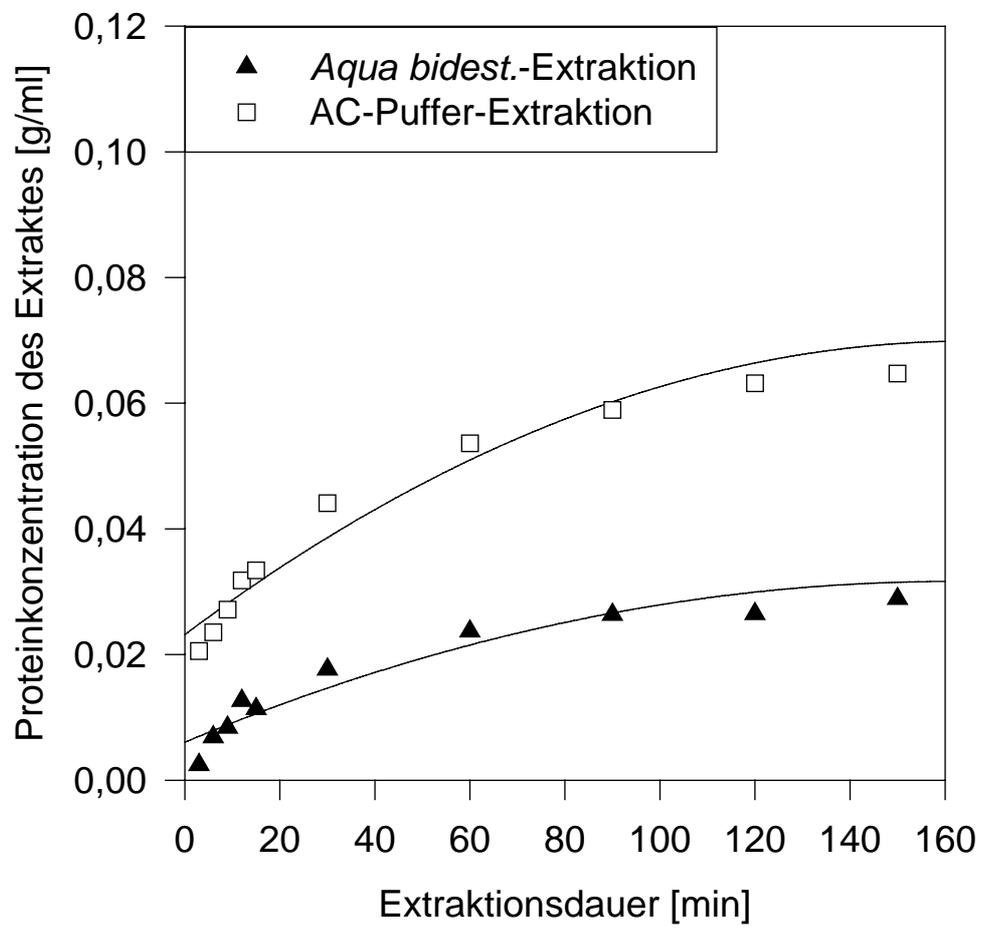


Abbildung 4.2-3 Proteingehalt von Erlenpollenextrakten

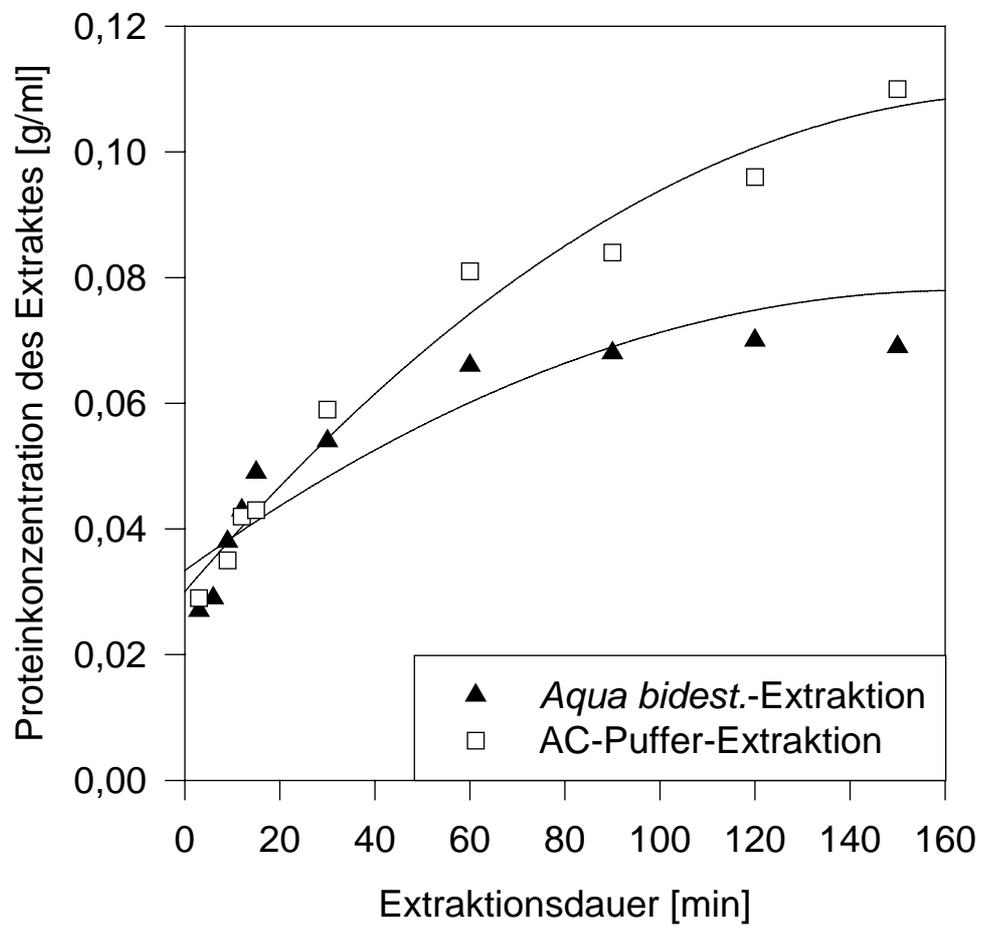


Abbildung 4.2-4 Proteingehalt von Birkenpollenextrakten

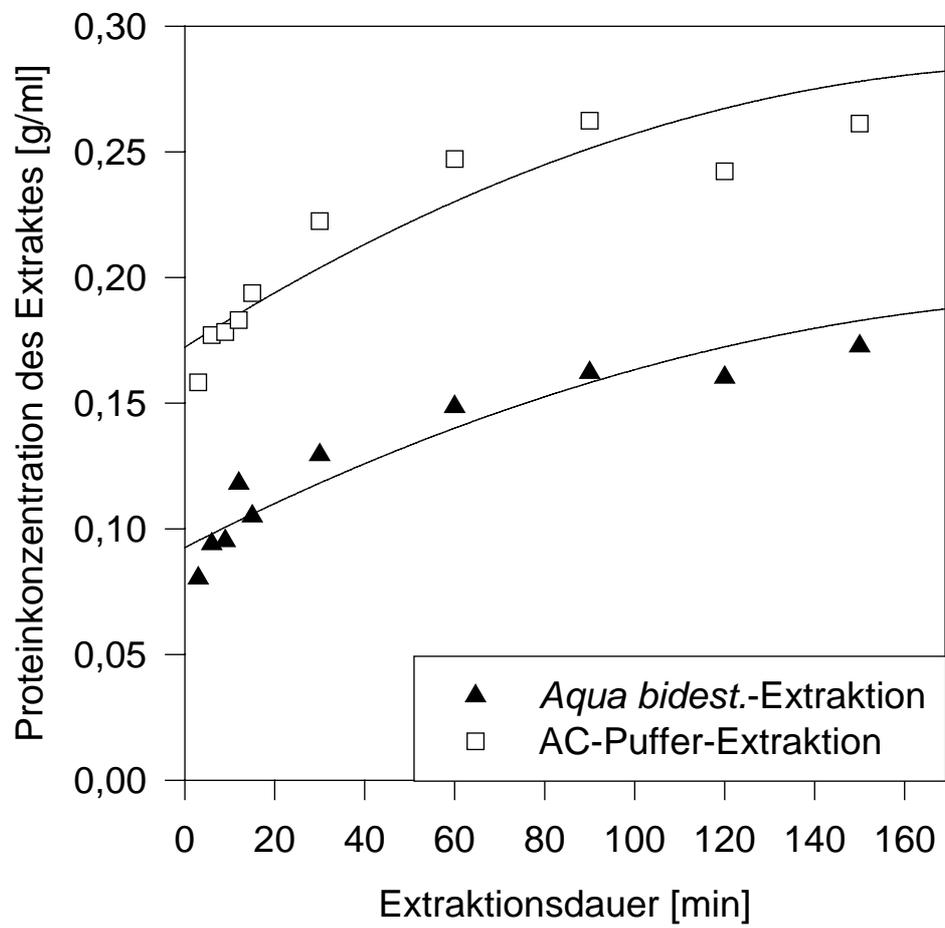


Abbildung 4.2-5 Proteingehalt von Honiggrasextrakten

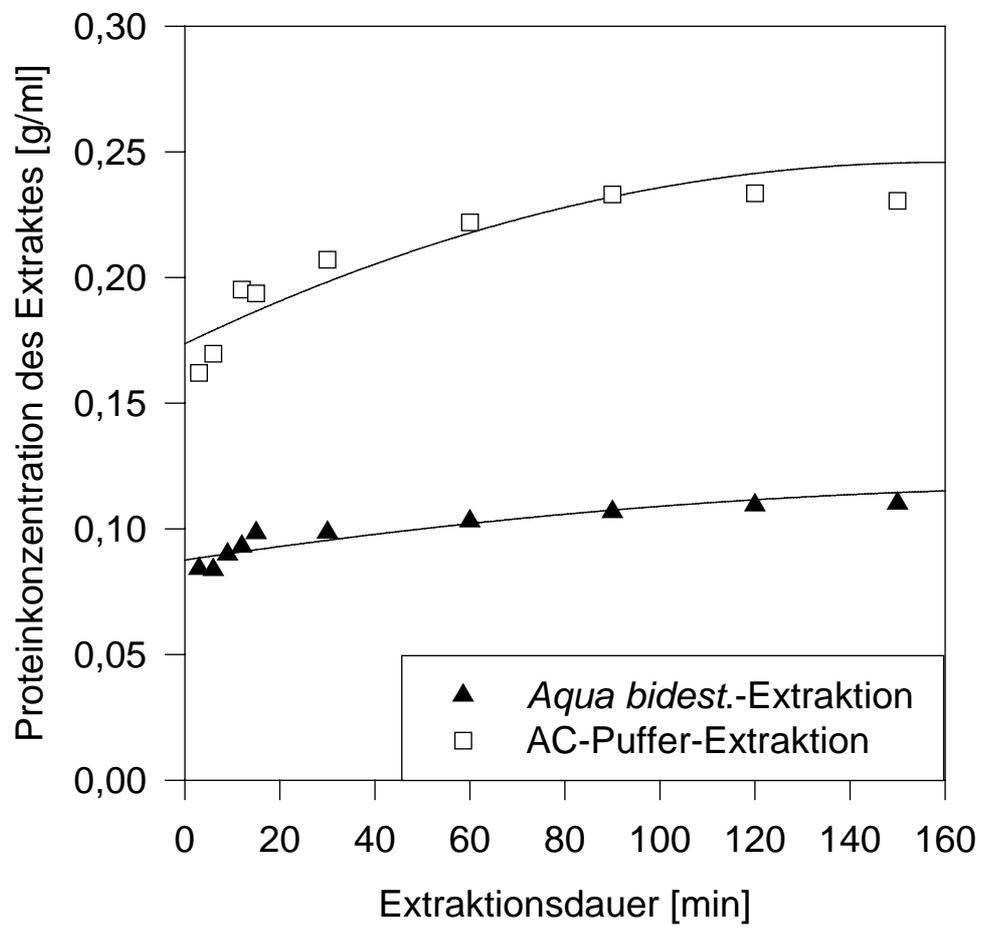


Abbildung 4.2-6 Proteingehalt von Beifußpollenextrakten

Für die Kinetik der Proteinfreisetzung zeigt sich für alle untersuchten Pollenarten, daß nach einem anfänglich steilen Anstieg nach spätestens 150 Minuten ein Plateau erreicht wird. Auffällig sind die quantitativen Unterschiede im Proteingehalt der Extrakte zwischen den einzelnen Pollenarten. Die höchsten Werte wurden für Honiggras und Beifuß, die niedrigsten Werte für Hasel- und Erlenpollen ermittelt. Mit Ammoniumcarbonatpuffer-Extraktion lassen sich wesentlich größere Proteinmengen aus den Pollen extrahieren (um ca. 50 % höhere Proteinkonzentration) als mit *Aqua bidest.* Eine 30minütige Extraktion schien für weitere Untersuchungen am geeignetesten, da eine Modulation der Kinetik durch Änderung der Expositionsparameter besser erkennbar ist, wenn sich der Zeitpunkt im aufsteigenden Schenkel der Kurve befindet. Desweiteren ist bei einer Extraktionszeit von 30 Minuten gewährleistet, daß alle Majorallergene in Lösung gehen, da Allergenität und Löslichkeit miteinander korrelieren [131].

#### 4.3 Einfluß der relativen Luftfeuchte auf Pollen

In der Literatur gibt es Hinweise, daß Pollen durch die relative Luftfeuchte beeinflusst werden (vgl. Abschnitt 1.4.2). Um diesen Zusammenhang unter kontrollierten *in vitro*-Bedingungen näher zu untersuchen, wurden allergologisch relevante Pollen (Hasel, Erle, Birke, Honiggras und Beifuß) bei verschiedenen relativen Luftfeuchten von 0, 40, 50, 60, 70 und 80 % rF über einen Zeitraum von insgesamt 9 Stunden im Wirbelschichtreaktor gegenüber synthetischer Luft exponiert.

Die Pollen wurden vor und nach 1,5 Stunden, 3 Stunden, 6 Stunden und 9 Stunden Exposition aus der Anlage entnommen und für 30 Minuten in *Aqua bidest.* bzw. AC-Puffer suspendiert und zentrifugiert. Danach wurden die so gewonnenen Extrakte sowohl photometrisch auf ihre Proteinkonzentration hin untersucht, als auch dem Immunoblotting zur semiquantitativen Allergendetektion zugeführt. In den *Abbildungen 4.3-1 bis 4.3-5* sind, getrennt für alle untersuchten Pollenarten, die relative Proteinkonzentration der Extrakte in Abhängigkeit von Expositionsdauer und relativer Luftfeuchte dargestellt. Der Proteingehalt der Extrakte nicht-exponierter Pollen wurde dabei auf 100 % gesetzt.

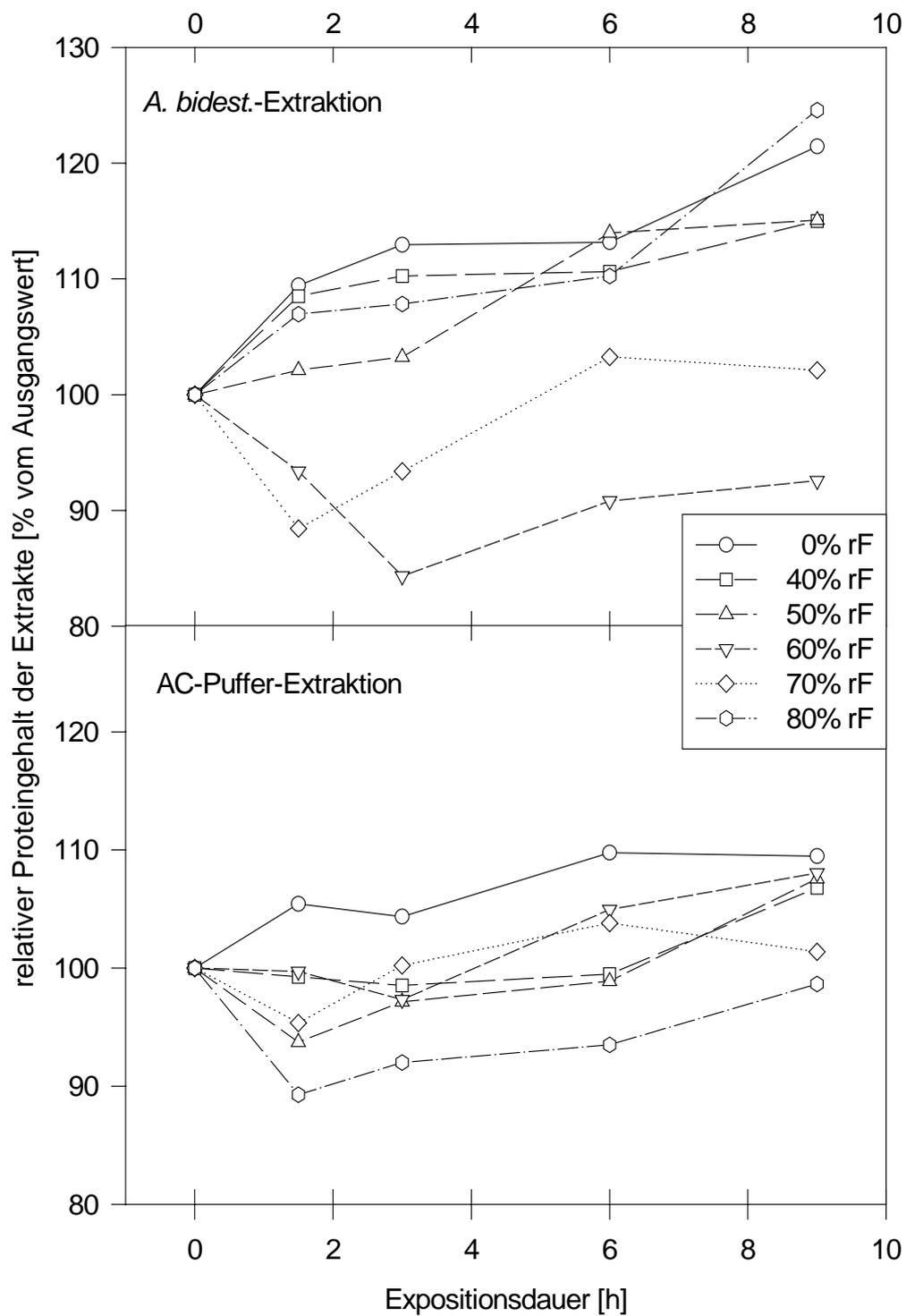


Abbildung 4.3-1 Proteinkonzentration der Haselpollenextrakte nach 30minütiger Extraktion

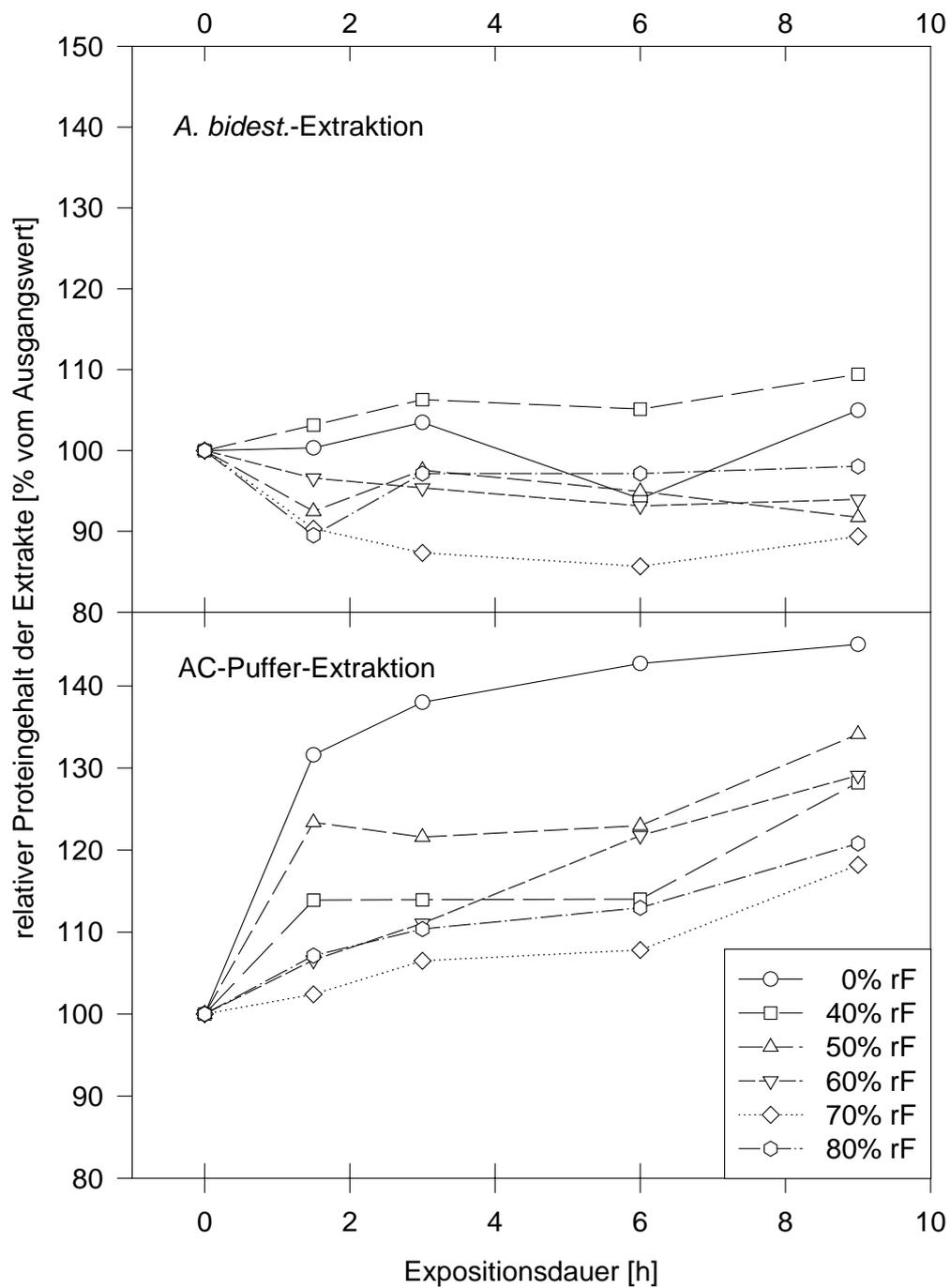


Abbildung 4.3-2 Proteinkonzentration der Erlenpollenextrakte nach 30minütiger Extraktion

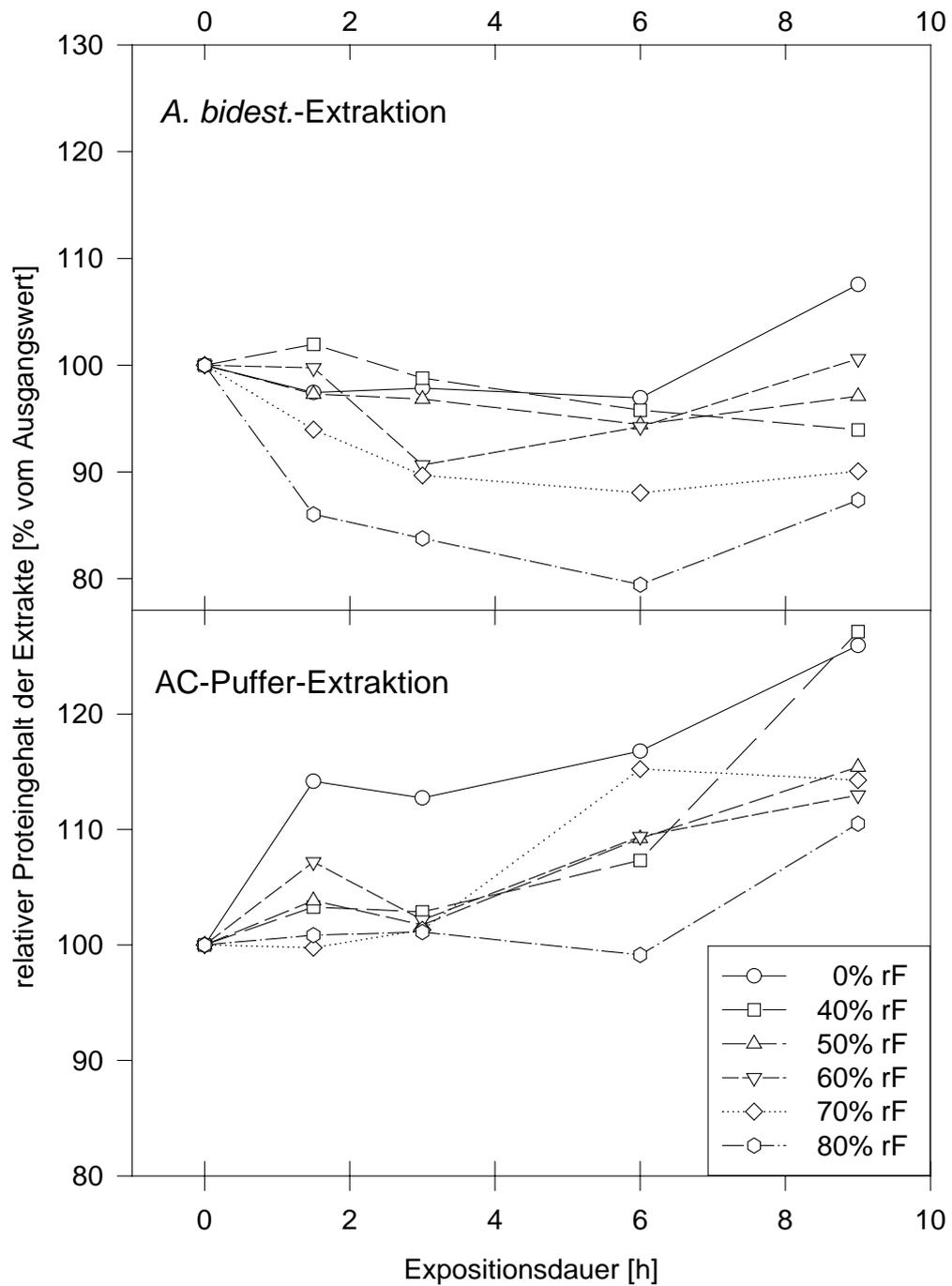


Abbildung 4.3-3 Proteinkonzentration der Birkenpollenextrakte nach 30minütiger Extraktion

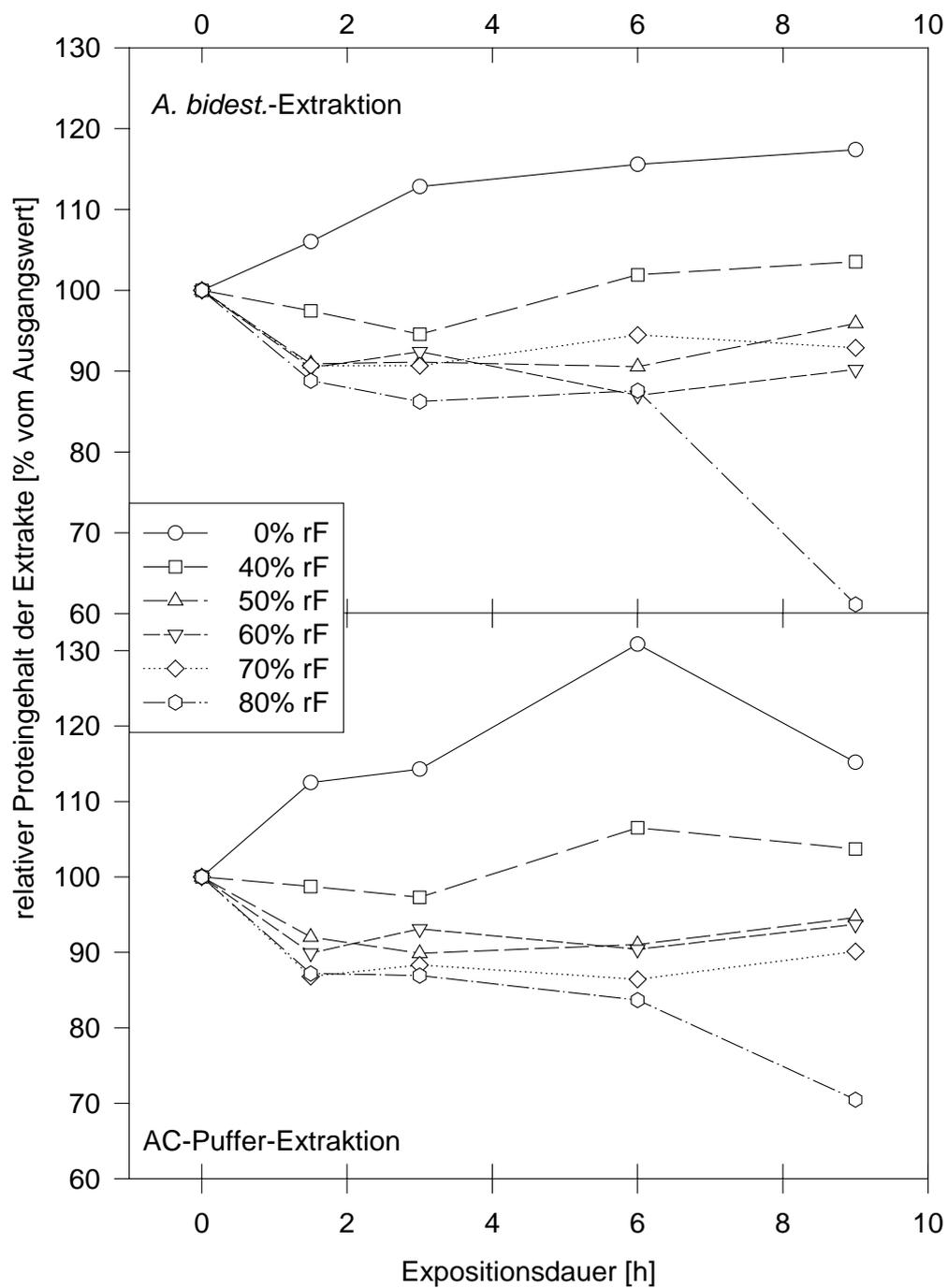


Abbildung 4.3-4 Proteinkonzentration der Honiggraspollenextrakte nach 30minütiger Extraktion

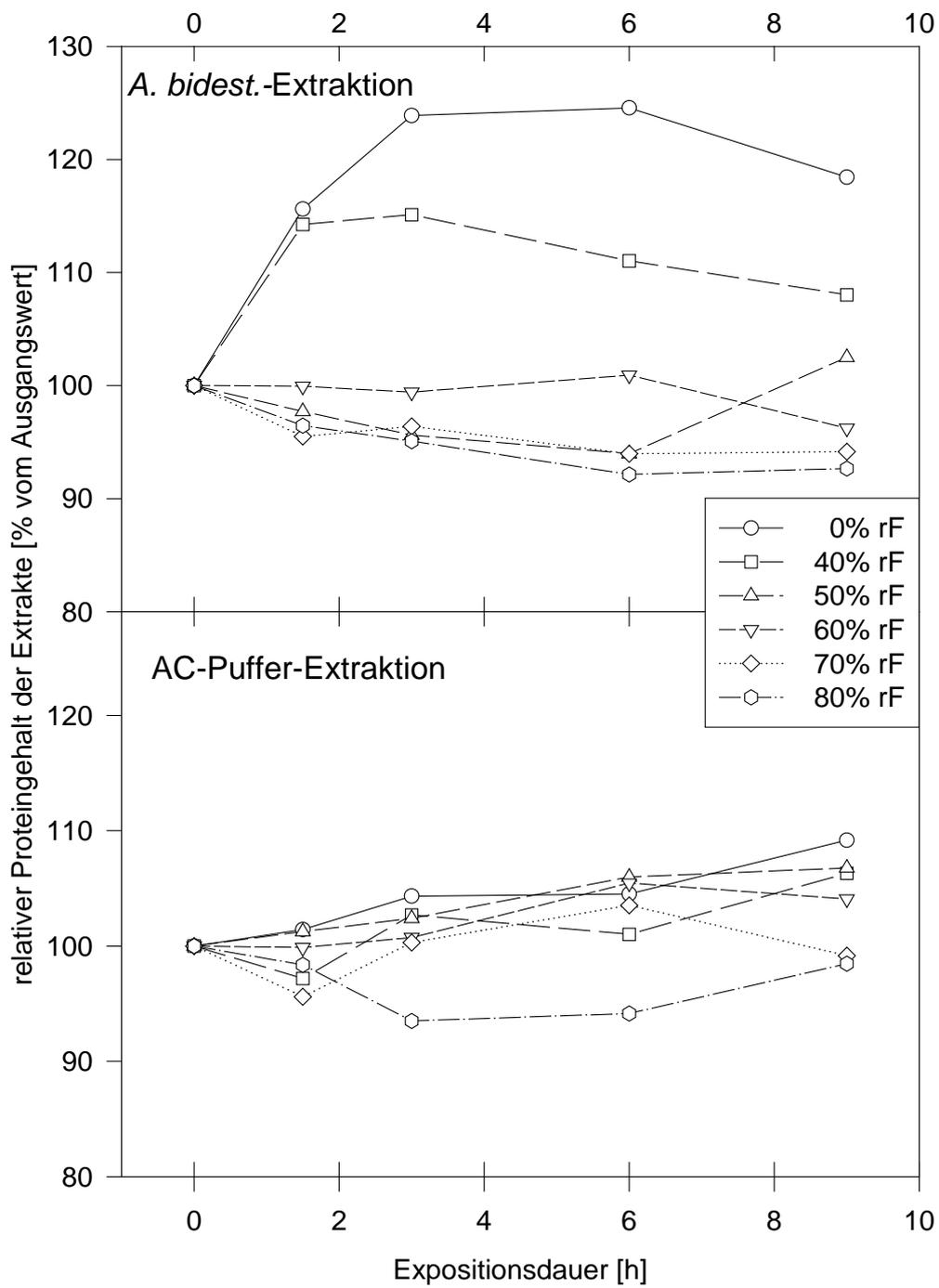


Abbildung 4.3-5 Proteinkonzentration der Beifußpollenextrakte nach 30minütiger Extraktion

Am Ergebnis zeigte sich ein für alle Pollenarten ähnlicher Expositionsablauf über die Zeit. Danach wird bei niedrigen Luftfeuchten insgesamt mehr Protein in die Extrakte freigesetzt als bei hohen Luftfeuchten. Dieses Verhalten ist bei Gras und Beifuß besonders ausgeprägt, während für Pollen von Hasel, Erle und Birke ein solches Reaktionsmuster nur ansatzweise, mit zum Teil ausgeprägten Abweichungen für die mit 80 % relativer Luftfeuchte exponierten und mit *Aqua bidest.* extrahierten Pollen, nachweisbar ist.

Hinsichtlich der Beurteilung des Einflusses der relativen Luftfeuchte auf die Proteinfreisetzung aus Pollen muß jedoch berücksichtigt werden, daß der beobachtete Effekt teilweise auf eine feuchtigkeitsbedingte Gewichtszunahme der Pollen während der Exposition zurückgeführt werden kann.

Um diesen Störeffekt rechnerisch eliminieren zu können, war es notwendig, für alle Pollen eine Trockengewichtsbestimmung durchzuführen und die Gewichtszunahme der Pollen pro Prozent relativer Luftfeuchtigkeit zu ermitteln.

Die *Abbildung 4.3-6* stellt die zu diesem Zweck vorgenommenen Messungen graphisch dar. In *Tabelle 4.3-1* sind die berechneten Daten für alle Pollen zusammengefaßt.

Nimmt man eine Korrektur der Ergebnisse der Proteinfreisetzungsmessung anhand der erhobenen Daten vor, so zeigt sich, daß der Einfluß der relativen Luftfeuchte auf Honiggras- und Beifußpollen auch unabhängig von der feuchtigkeitsbedingten Gewichtszunahme deutlich nachweisbar ist. Zum Zweck der Prüfung der Signifikanz des beobachteten Effekts wurden die korrigierten, relativen Proteinkonzentrationen der Extrakte von über 6 Stunden Dauer exponierten Pollen im Verhältnis zur relativen Luftfeuchtigkeit in *Abbildung 4.3-7* und *4.3-8* dargestellt. *Tabelle 4.3-2* zeigt die relevanten statistischen Daten.

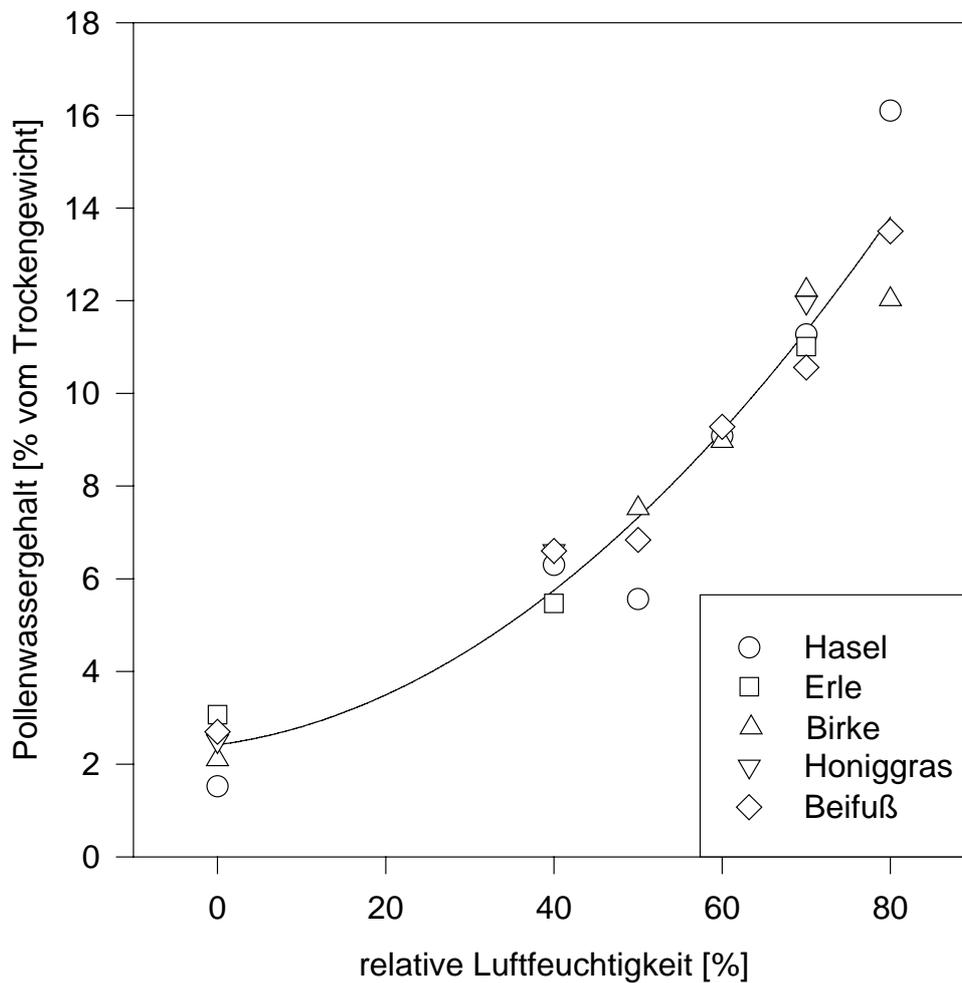


Abbildung 4.3-6 Wassergehalt von Pollen in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchte

Tabelle 4.3-1 Pollengewichtszunahme pro % relative Feuchte

Pollenart	Pollengewichtszunahme pro % relative Feuchte [%]	Untersuchungsbereich relative Feuchte [%]
Hasel	0,168	0 - 80
Erle	0,113	0 - 70
Birke	0,124	0 - 80
Honiggras	0,135	0 - 70
Beifuß	0,135	0 - 80

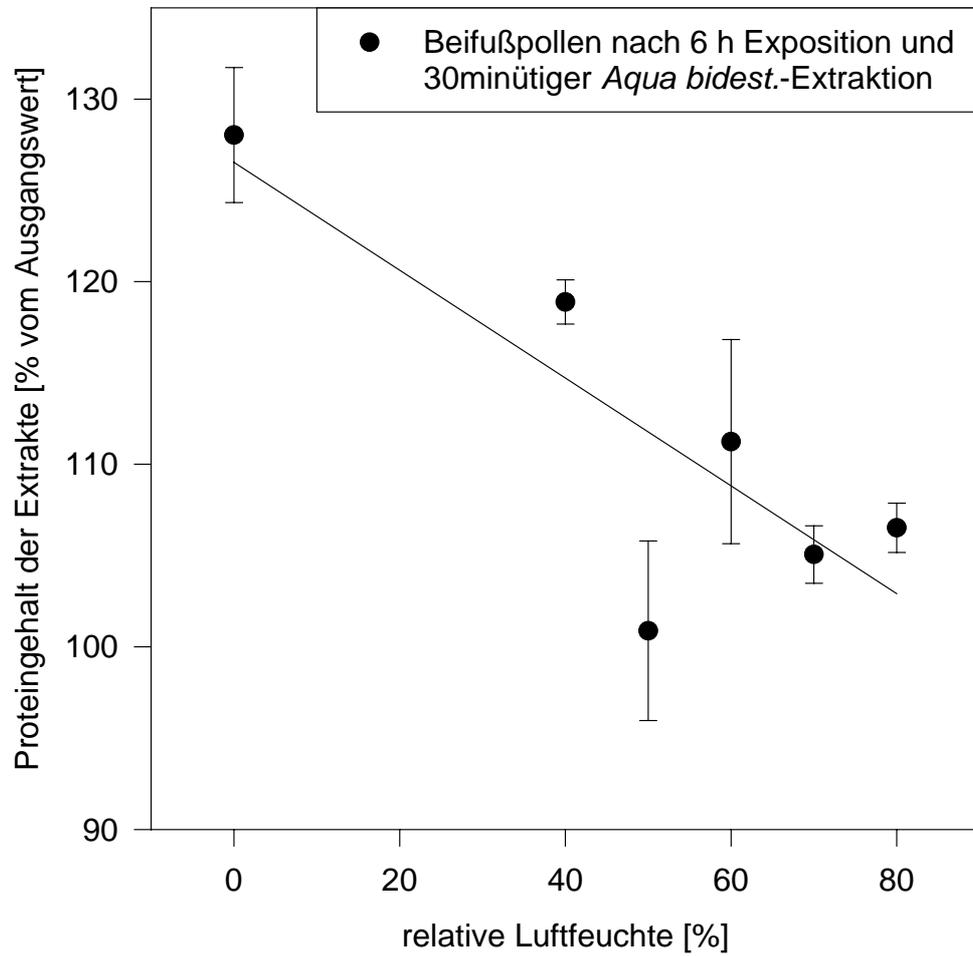


Abbildung 4.3-7 6stündige Exposition von Beifußpollen bei verschiedenen relativen Luftfeuchten, 30minütige Extraktion in *A. bidest.* als Extraktionsmedium

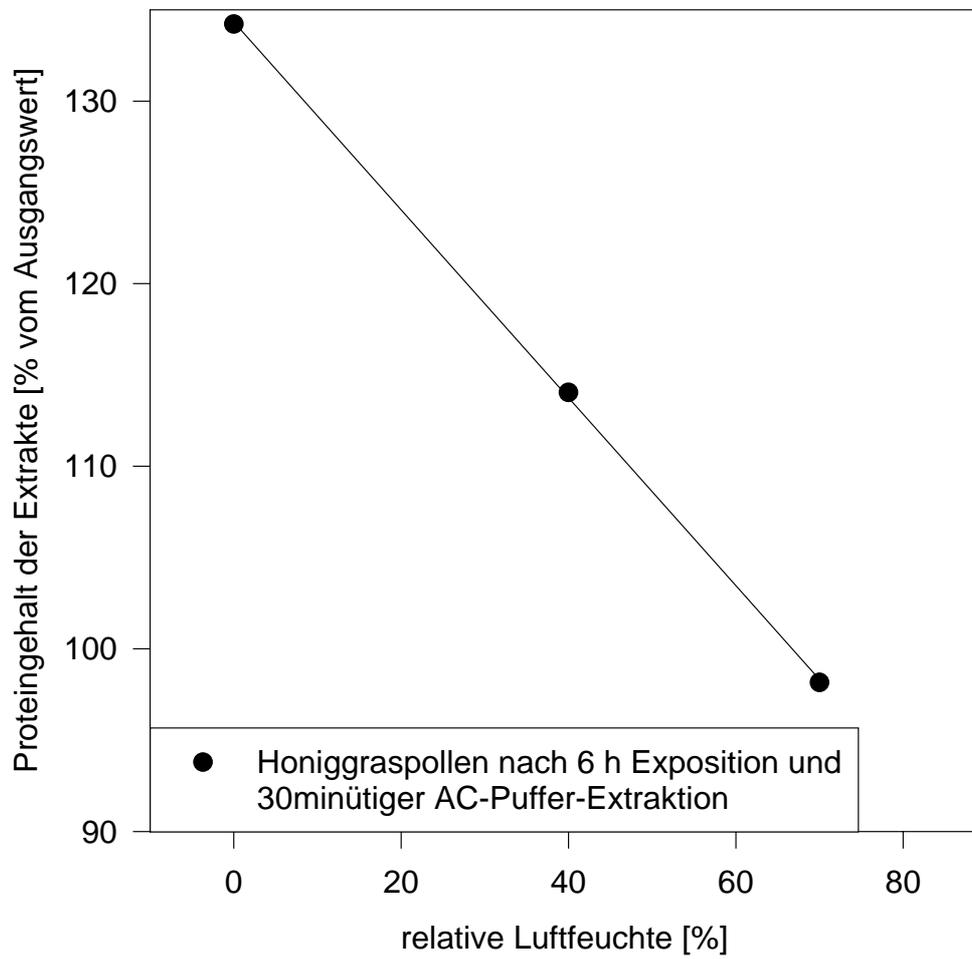


Abbildung 4.3-8 6stündige Exposition von Honiggraspollen bei verschiedenen relativen Luftfeuchten, 30minütige Extraktion in AC-Puffer als Extraktionsmedium

*Tabelle 4.3-2* Korrelation von relativer Luftfeuchte und Proteingehalt der Extrakte (statistisch signifikante Werte mit  $p < 0,05$  wurden mit \* markiert,  $p$ =Irrtumswahrscheinlichkeit, t-Test)

Pollenart	Hasel	Hasel	Erle	Erle	Birke	Birke
Extraktionsmedium	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer
p	0,6169	0,5839	0,976	0,2922	0,6286	0,9325
Pollenart	Honiggras	Honiggras	Beifuß	Beifuß		
Extraktionsmedium	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer		
p	0,1852	0,0087*	0,041*	0,3		

In den *Abbildungen 4.3-7* und *4.3-8* ist exemplarisch die negative Korrelation von relativer Luftfeuchte und relativem Proteingehalt der Extrakte nach 6stündiger Exposition im Verhältnis zum Ausgangswert für die *Aqua bidest.*-Extraktion von Beifußpollen bzw. die AC-Puffer-Extraktion von Honiggraspollen gezeigt: Danach liegt für Beifußpollen der relative Proteingehalt des Extraktes bei 0 % relativer Luftfeuchtigkeit um 28 %, für Honiggraspollen um 34 % über dem Ausgangswert. Bei 80 % relativer Luftfeuchtigkeit zeigt sich für Beifußpollen ein gegenüber dem Ausgangswert um 6,5 % gesteigerter, für Honiggraspollen ein um 2 % reduzierter relativer Proteingehalt.

Wie aus *Tabelle 4.3-2* ersichtlich ist, handelt es sich dabei um statistisch signifikante Korrelationen. Diese ließen sich für andere untersuchte Pollenarten nicht feststellen.

Um zu prüfen, ob die relative Luftfeuchte auch spezifische Effekte auf der Ebene der Pollenallergene hervorruft, wurden alle Extrakte auch in der SDS-PAGE aufgetrennt, mit der Westernblotting-Technik auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit monoklonalen Antikörpern oder Patientenserum angefärbt.

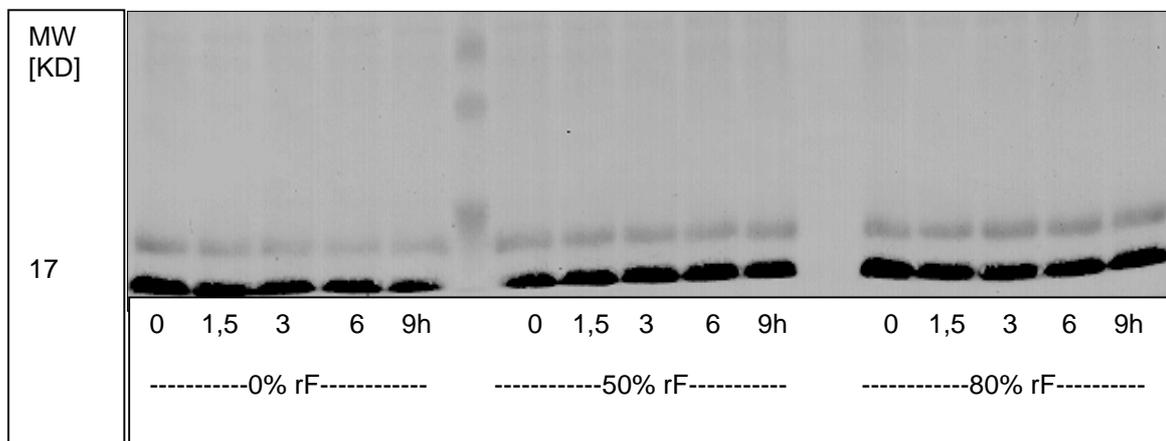
Alle Proben wurden auf den gleichen Gesamtproteingehalt der aufzutrennenden Extrakte eingestellt, ein Teil auch auf das gleiche Probenvolumen. Es zeigten sich bei keinem der insgesamt 144 Westernblots signifikante, expositionszeitabhängige Veränderungen im Bandenmuster, die für eine expositionbedingte Modulation der

Allergenität hinweisend gewesen wären. Somit lässt sich auf immunologischer Ebene keine Beeinflussung durch die relative Luftfeuchte nachweisen.

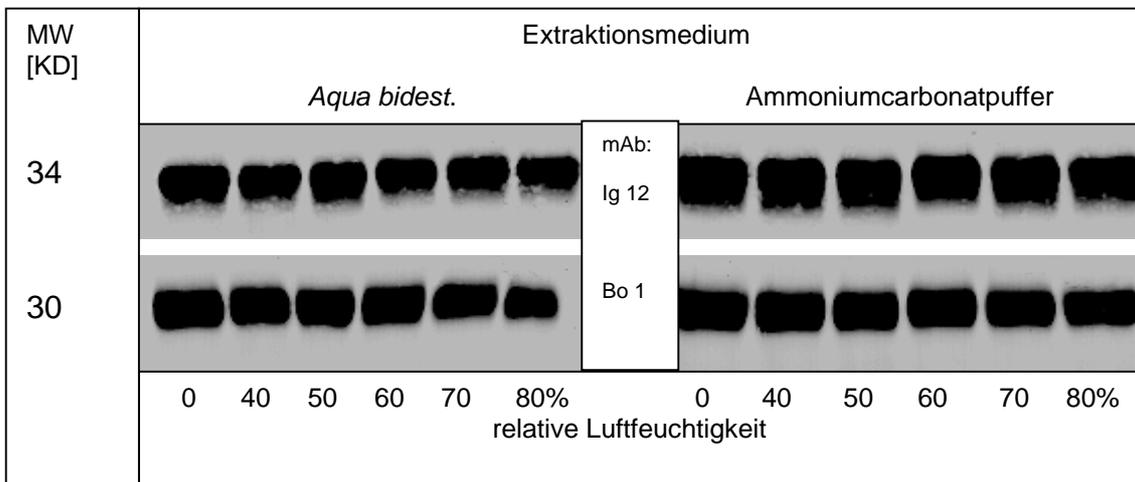
*Tabelle 4.3-3* zeigt eine Übersicht über die Immunoblots. *Abbildung 4.3-9* und *4.3-10* zeigen die relevanten Westernblots.

*Tabelle 4.3-3* Übersicht über alle angefertigten Westernblots (Ps=Patientenserum; mAb=monoklonale Antikörper)

Pollenart	Anzahl der Blots	Allergen- / Proteindetektion mit
Hasel	16	Ps1, Ps2, India ink, AuroDye
Erle	11	Ps2, India ink, Auro Dye
Birke	21	Ps3, Ps2, India ink, AuroDye
Honiggras	80	mAb Ig12, mAb Bo1, India ink, AuroDye
Beifuß	16	Ps1, Ps2, India ink, AuroDye



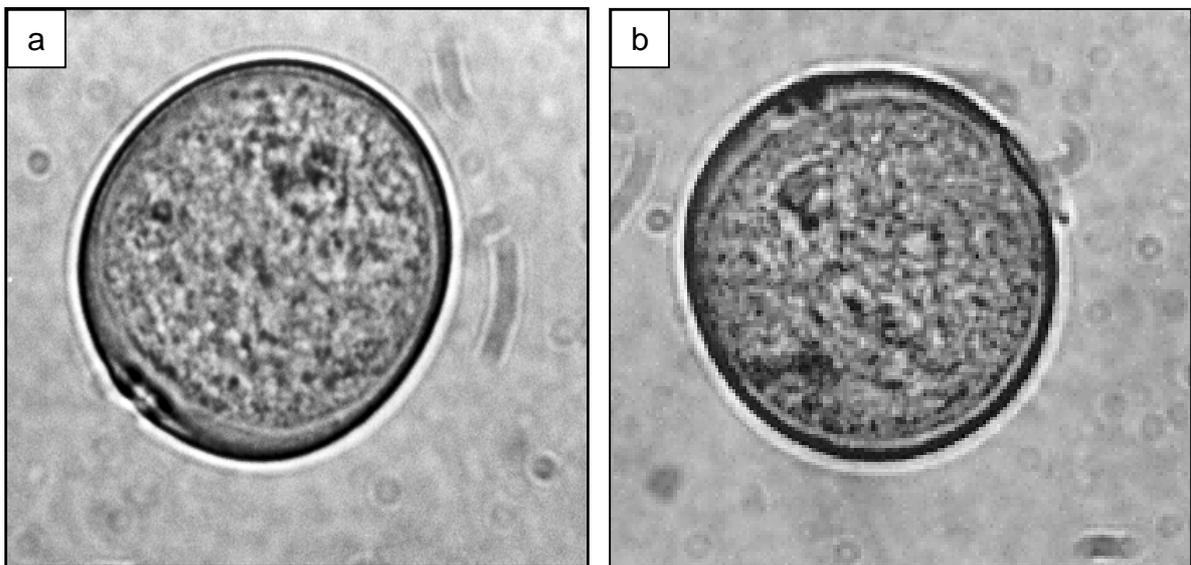
*Abbildung 4.3-9* Westernblot von AC-Pufferextrakten von Haselpollen nach Exposition bei 0 %, 50 % und 80 % relativer Luftfeuchte im Zeitverlauf und nach Anfärbung mit Patientenserum (Ps)



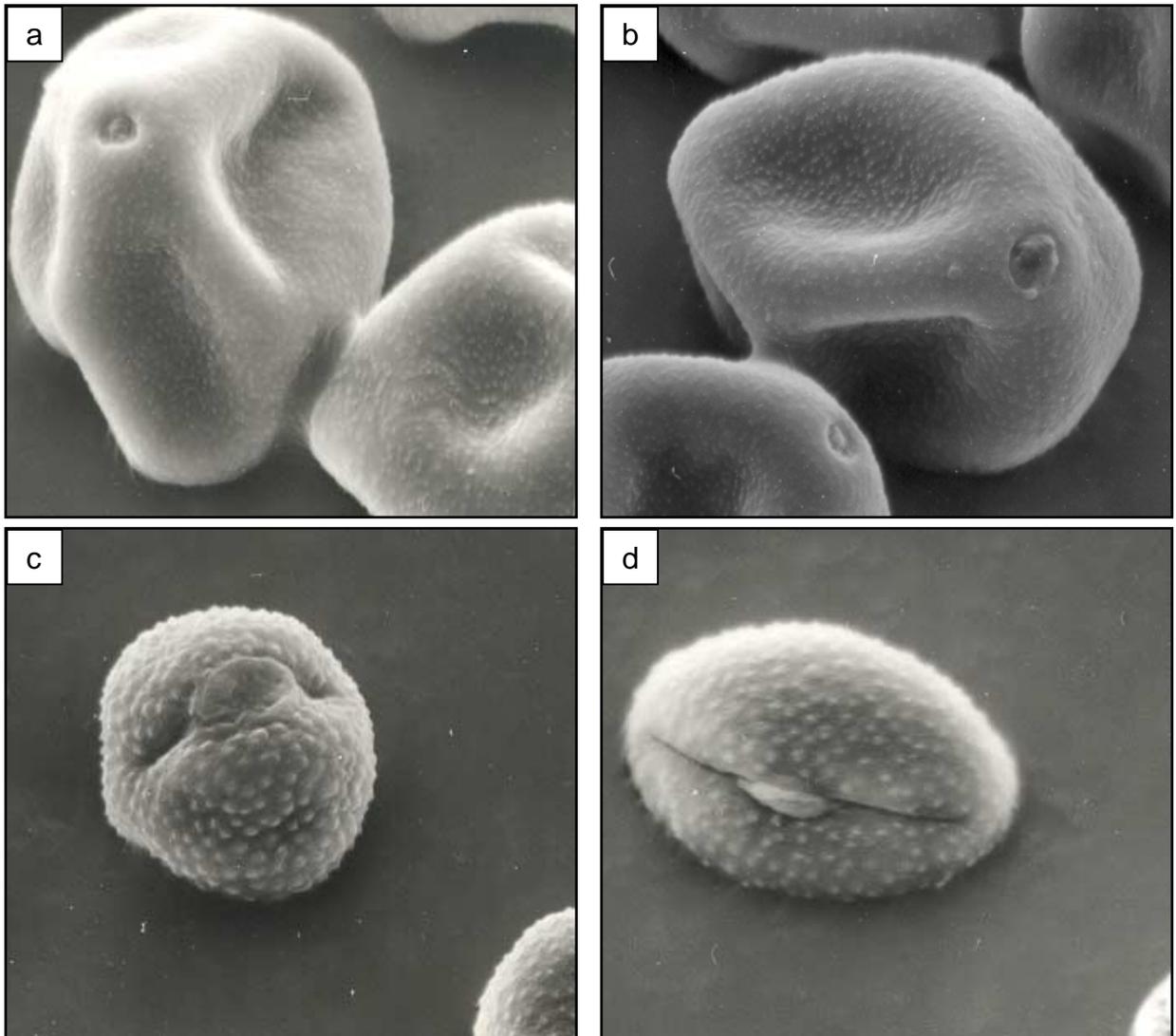
*Abbildung 4.3-10* Westernblots von Honiggraspollenextrakten nach Exposition der Pollen bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchtigkeiten und Färbung mit den mAb Ig12 und Bo1

In der Übersicht über die licht- und rasterelektronenmikroskopischen Präparate, die bei jedem Expositionsversuch angefertigt wurden, war keine morphologische Veränderung der Pollenkörner erkennbar.

Die *Abbildungen 4.3-11 a* und *b* zeigen lichtmikroskopische Darstellungen von Honiggraspollen. In den *Abbildungen 4.3-12 a* bis *d* sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Pollen gezeigt.



*Abbildung 4.3-11* Lichtmikroskopie von Honiggraspollen nach 6 h Exposition bei 50 % rF (a) und 6 h Exposition bei 0 % rF (b) jeweils mit synth. Luft (100fache Vergrößerung)



*Abbildung 4.3-12* Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Hasel (a,b) und Beifuß (c,d) -Pollen:

- (a) Haselpollen, nicht exponiert
  - (b) Haselpollen, 9 h bei 50 % rF mit synth. Luft exponiert
  - (c) Beifußpollen, nicht exponiert
  - (d) Beifußpollen, 9 h bei 50 % rF mit synth. Luft exponiert
- (2500fache Vergrößerung)

(SEM-Aufnahmen: Dr. rer. nat. J. Tomczok, Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie, Technische Universität München)

#### 4.4. Einfluß von Schwefeldioxid auf Pollen

Zur Untersuchung der Wirkung einer Schwefeldioxidexposition auf Pollen wurden drei Versuchsserien exemplarisch mit dem wolligen Honiggras durchgeführt.

Dabei wurden Pollen im Wirbelschichtreaktor 9 Stunden lang gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von Schwefeldioxid bei verschiedenen relativen Luftfeuchten exponiert und auf ihren Proteingehalt sowie Allergengehalt im Extrakt untersucht. Die *Tabelle 4.4-1* zeigt die Versuchsbedingungen der mit SO<sub>2</sub> durchgeführten Expositionen.

*Tabelle 4.4-1* Übersicht über die mit SO<sub>2</sub> durchgeführten Expositionsversuche sowie zugehörige Kontrollen

Vers.-Nr.	Pollenart	SO <sub>2</sub> -Konzentration in		rF	
		Wirbelschichtreaktor 1	Wirbelschichtreaktor 2 (Kontrolle)		
Versuchsserie I:					
1	Holcus lanatus	20 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,0076 ppm	0 ppm	60 %
2	Holcus lanatus	80 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,0304 ppm	0 ppm	60 %
3	Holcus lanatus	125 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,0477 ppm	0 ppm	60 %
4	Holcus lanatus	350 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,133 ppm	0 ppm	60 %
5	Holcus lanatus	2620 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	1,000 ppm	0 ppm	60 %
Versuchsserie II:					
6	Holcus lanatus	350 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,133 ppm	0 ppm	0 %
7	Holcus lanatus	350 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,133 ppm	0 ppm	40 %
8	Holcus lanatus	350 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,133 ppm	0 ppm	50 %
9	Holcus lanatus	350 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,133 ppm	0 ppm	60 %
10	Holcus lanatus	350 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	0,133 ppm	0 ppm	80 %
Versuchsserie III:					
11	Holcus lanatus	13100 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	5,000 ppm	0 ppm	0 %
12	Holcus lanatus	13100 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	5,000 ppm	0 ppm	50 %
13	Holcus lanatus	13100 µg SO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	5,000 ppm	0 ppm	80 %

Die Kinetik der Proteinfreisetzung wurde in Hinblick auf die SO<sub>2</sub>-Exposition der Gräserpollen untersucht.

Die *Abbildung 4.4-1* zeigt die graphische Darstellung der Daten für mit 13.100 µg SO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> sowie mit 350 µg SO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> exponierte Honiggraspollen mit den zugehörigen Kontrollen (Vers.-Nr.: 6, 10, 11, 12).

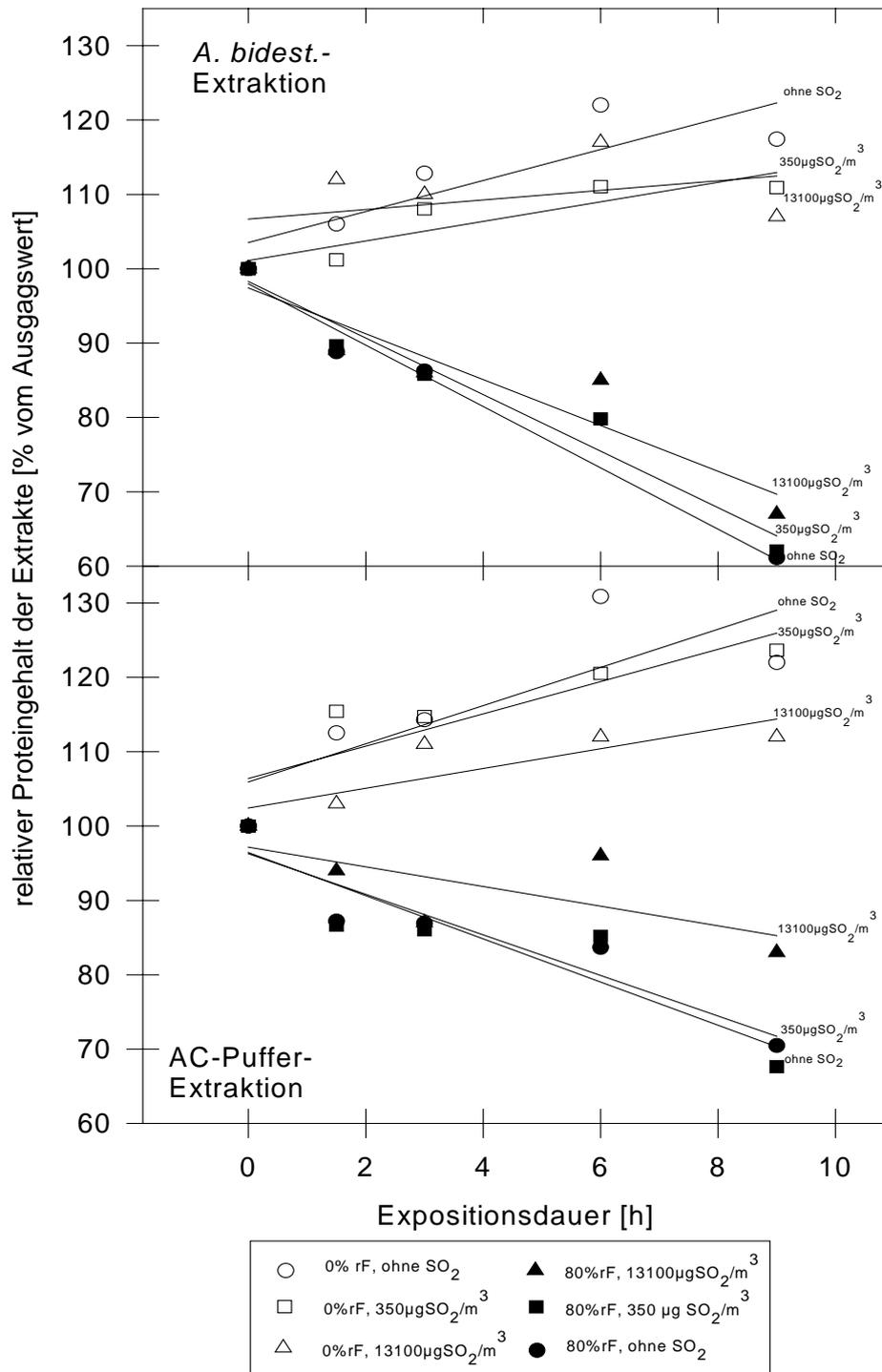


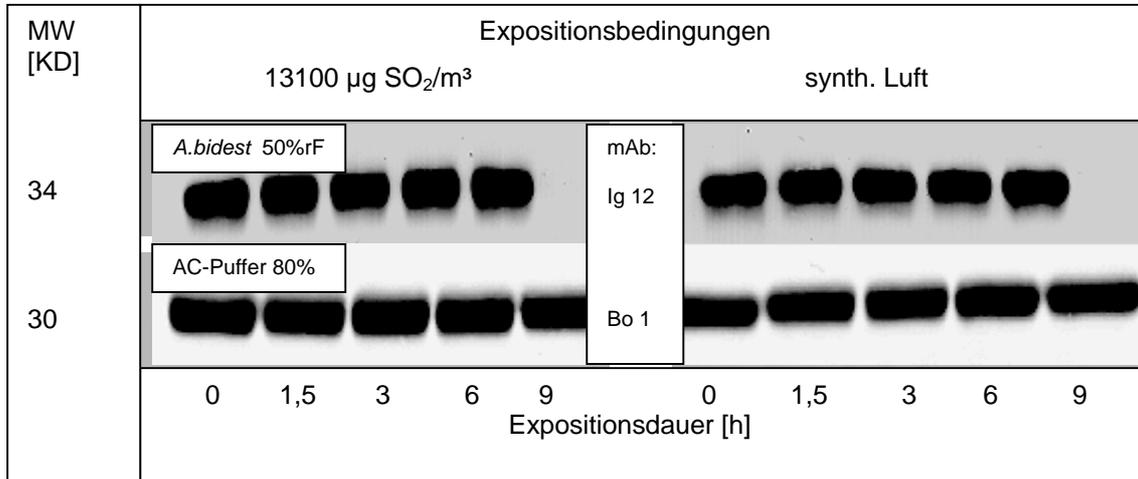
Abbildung 4.4-1 Relativer Proteingehalt in Extrakten von Honiggraspollen, die mit 350 µg SO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> und 13100 µg SO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> exponiert wurden, sowie zugehörige Kontrollen [in % vom Ausgangswert vor Expositionsbeginn]

Es zeigt sich, daß auch bei SO<sub>2</sub>-Exposition wie in den Kontrollen die negative Korrelation zwischen relativer Luftfeuchte und Proteingehalt der Extrakte nachweisbar ist: Pollen, die bei 0 % relativer Luftfeuchte exponiert worden waren, zeigen einen zeitabhängigen Anstieg der Proteinkonzentrationen der Extrakte, während der Proteingehalt der Extrakte von Pollen, die bei 80 % relativer Luftfeuchte exponiert wurden über die Expositionszeit hin abfällt.

Vergleicht man die Proteinkonzentrationen der Extrakte schadgasexponierter Pollen mit denjenigen der Kontrolleexperimente, so wird deutlich, daß der Einfluß der relativen Luftfeuchte bei den SO<sub>2</sub>-Versuchen weniger ausgeprägt ist. Bei genauer Analyse der Daten kann man feststellen, daß die negative Korrelation zwischen relativer Luftfeuchtigkeit und Proteinkonzentration der Extrakte um so deutlicher reduziert ist, je höher die Konzentration des Schwefeldioxids eingestellt wurde. Diese Beobachtung ist sowohl für Extraktionsverfahren mit *Aqua bidest.*, als auch für Ammoniumcarbonatpuffer zutreffend und zeigt sich am deutlichsten nach einer Expositionsdauer von 6 und 9 Stunden.

Um auch auf Allergenebene den Einfluß einer Schwefeldioxidexposition untersuchen zu können, wurden von allen gewonnenen Extrakten SO<sub>2</sub>-exponierter Pollen Immunoblots angefertigt, welche mit den monoklonalen Antikörpern Ig12 (markiert Hol I 1) und Bo1 (markiert Hol I 5b) angefärbt wurden.

In keinem der erstellten Westernblots, in denen Honiggraspollen untersucht wurden, die über das weite Konzentrationsspektrum von 20 bis 13100 µg SO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> (=0,0076 bis 5 ppm) exponiert worden waren, konnten signifikante Änderungen im Bandenmuster im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Die *Abbildung 4.4-2* zeigt die entsprechenden Westernblots.



*Abbildung 4.4-2* Westernblots von Extrakten aus Honiggraspollen nach Exposition mit 5 ppm SO<sub>2</sub> bei 50 % und 80 % rF, sowie zugehörige Kontrollen (synth. Luft). Anfärbung mit den mAb Ig 12 und Bo 1

Auch bei den licht- und rasterelektronenmikroskopischen Präparaten der schwefeldioxidexponierten Pollen, die bei dieser Versuchsreihe angefertigt wurden, konnten keine Veränderungen der Pollen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Einfluß von Luftfeuchte auf die Protein- und Allergenfreisetzung aus Pollen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß es möglich ist, in einer Wirbelschichtanlage Pollen in der Schwebelage zu halten und atmosphärische Einflüsse, wie z.B. relative Luftfeuchte oder Schadgase, zu untersuchen.

Sie zeigen weiter, daß die Proteinfreisetzung aus Pollen in Abhängigkeit zur relativen Luftfeuchte erfolgt. Danach besteht für Pollen der Arten Honiggras und Beifuß eine signifikante, negative Korrelation zwischen relativer Luftfeuchte und dem Proteingehalt der Extrakte, d.h. Pollen, die bei 80 % rF exponiert wurden, setzen bei Extraktion signifikant weniger Protein frei als solche bei 40 % rF. Je trockener die Luft während der Exposition der Pollen ist, desto höher liegt die Proteinkonzentration der Extrakte. Dieser Effekt zeigt sich besonders nach 6stündiger Exposition für Honiggraspollen ( $p=0,0087$ ) nach AC-Puffer-Extraktion und für Beifußpollen ( $p=0,041$ ) bei Extraktion mit *Aqua bidest.* Für Hasel-, Erlen- und Birkenpollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proteinfreisetzung in Abhängigkeit von der rF.

Die Befunde für Honiggras und Beifuß waren auch nach Anpassung der Daten mittels Trockengewichtsbestimmung (errechnete Pollengewichtszunahme pro Prozent relativer Luftfeuchte) signifikant. Die Gewichtszunahme der Pollen lag zwischen 0,113 und 0,168 % pro Prozent ansteigender relativer Luftfeuchte.

Diese Ergebnisse sind mit den von BROWN *et al.* [18] publizierten Daten vergleichbar, die für *Dactylis glomerata*-Pollen 2 bis 3 µg Gewichtszunahme pro Prozent rF und mg Trockengewicht bei ansteigender relativer Feuchte zeigten.

Sie erlauben eine Korrektur der Proteinwerte für die unterschiedlichen relativen Luftfeuchten.

Auffällig ist, daß es sich bei Pollen, die auf die relative Luftfeuchte reagieren – dem Honiggras, das zur Familie der Gramineae gehört, und dem Beifuß, aus der Familie der Compositae - um trinukleäre Pollen handelt. HOEKSTRA und BRUINSMA [54] untersuchten die durch Hydratation angestoßenen metabolischen Prozesse am Pollen und konnten zeigen, daß trinukleäre Pollen im Vergleich zu binukleären Pollen, zu denen Hasel, Erlen und Birke gehören, besonders stark auf

eine Feuchtigkeitsaufnahme reagieren. Bei hoher relativer Luftfeuchte war die Respirationsrate bei den trinukleären Gramineae und Compositae bezogen auf 1 mg Pollen auf das 2 bis 3fache gegenüber binukleären Pollen gesteigert. Besonders empfindlich reagierten Gräserpollen auf Veränderungen der relativen Luftfeuchte.

HESLOP-HARRISON [52] konnte darüber hinaus zeigen, daß während der Rehydration von Pollen, welche der Keimung vorrausgeht, nicht nur Feuchtigkeit durch das Pollenkorn aufgenommen wird, sondern gleichzeitig auch eine ausgeprägte Exsudation einsetzt. Bei diesem Prozeß kann ein Flüssigkeitsvolumen von bis zu 15 % des Gesamtvolumens des Pollens abgegeben werden, wodurch sich erklären läßt, wieso es trotz Flüssigkeitsaufnahme nicht zu einer Vergrößerung des Pollens kommt. Der Flüssigkeitsaustritt kann sowohl über die Apertur, als auch über die poröse Exine erfolgen.

Die Exsudation über die Exine erfolgt innerhalb von Sekunden und löst im Bereich der Exine lokalisiertes Protein. Erfolgt der Flüssigkeitsaustritt jedoch über die Keimpore, so tritt die Exsudation erst wenige Minuten nach Beginn der Hydratation ein, und im Exsudat läßt sich Protein der Intine nachweisen [49; 51; 52; 56].

Untersuchungen zum Verhalten der Pollen während der Hydratation, die von GILISSEN [43] und ELLMANN *et al.* [35] durchgeführt wurden, legen Veränderungen der Pollenwand in Abhängigkeit vom Hydrationszustand nahe. So wurde gezeigt, daß die Wand hydrierter Pollen von Wassermolekülen leichter penetriert werden kann als von ausgetrockneten Pollen, die eine höhere Rigidität aufweisen. Dieser Mechanismus erklärt auch den verstärkten Austritt eines proteinhaltigen Exsudats aus Pollen während der Rehydration auf dem Stigma [43; 52].

Die in der Literatur verfügbaren Arbeiten zeigen deutlich, daß sensible hydrodynamische Prozesse am Pollen ablaufen, daß eine Rehydration zu einer verstärkten Proteinfreisetzung führen kann und daß insbesondere bei trinukleären Pollen metabolische Prozesse eng mit der relativen Luftfeuchte verknüpft sind.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene negative Korrelation zwischen der relativen Luftfeuchte und der Proteinfreisetzung in Honiggras- und

Beifußpollenextrakten ist somit möglicherweise im Sinne der oben beschriebenen Mechanismen zu verstehen: Hohe relative Luftfeuchtigkeit könnte bei trinukleären Pollen durch die damit verbundene Exsudation zu einer Allergen- und Proteinfreisetzung in den Luftstrom während der Exposition im Wirbelschichtreaktor führen. Proteinreiches Aerosol könnte dann auf aerogenem Wege die Expositions-kammer im Abluftstrom verlassen. Es verbleiben Pollenkörner mit einem reduzierten Proteingehalt, der sich auch in den im folgenden hergestellten Extrakten zeigt, in der Kammer.

Mit dieser Hypothese sind auch die Daten von PEKHONEN [94] vereinbar, die anhand von Messungen allergener Aktivität in verschiedenen aerogenen Partikelfraktionen erhoben wurden und auf einen Transport von Pollenallergenen gebunden an kleinste Wassertröpfchen bei hoher relativer Feuchte hinweisen. Aufgrund der Allergenfreisetzung während des Pollenfluges fanden sich in der Fraktion  $>7,2 \mu\text{m}$  viele von allergenem Material entleerte Pollen.

Als Erklärungsansatz für die bei Exposition mit niedriger Luftfeuchte gegenüber dem Ausgangswert erhöhte Proteinkonzentration in den Extrakten von Honiggras- und Beifußpollen, ist das Ausbleiben eines exsudationsbedingten Proteinverlustes während der Exposition und eine verstärkte Proteinfreisetzung bei der wässrigen Extraktion anzunehmen. Der diesem Befund zugrundeliegende Mechanismus ist unbekannt, scheint jedoch insbesondere für trinukleäre Pollen spezifisch zu sein.

Auffällig ist auch, daß die Extrakte von Honiggras- und Beifußpollen im Vergleich zu allen anderen untersuchten Pollenarten die bis zu 6fache Proteinmenge enthalten (vgl. Abschnitt 4.2). Es ist deshalb vorstellbar, daß Phänomene, die für Honiggras- und Beifußpollen im Rahmen der Proteinfreisetzung beobachtet werden konnten, bei Hasel-, Erlen- und Birkenpollen aufgrund des quantitativ geringeren Proteingehaltes der Extrakte nicht mehr als signifikant feststellbar sind. Anzumerken ist, daß in Expositionsversuchen mit Hasel- bzw. Erlenpollen bei 80 % rF entgegen dem sonst zu beobachtenden Kurvenverlauf zunächst nur eine sehr geringe Abnahme der Proteinkonzentration der Extrakte und dann eher ein Anstieg eintritt.

Dieser Befund ist wohl am ehesten auf Meßungenauigkeiten zurückzuführen, da Hasel- und Erlenpollen die niedrigsten Proteinmengen freisetzen.

Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß die benannten Abweichungen besonders nach Extraktionen in *Aqua bidest.* auftraten, bei denen noch weniger Protein extrahierbar war als mit AC-Puffer.

Auch die Bildung von Pollenaggregaten, die bei hohen relativen Luftfeuchten von 80 % rF gelegentlich auftraten und mit einer Erhöhung der Parameter Gasfluß und Impulsgeberfrequenz nicht immer zu kontrollieren waren (und zum Teil sogar zum Versuchsabbruch führten) könnte zur Erklärung beitragen.

Darüber hinaus war die Differenz zwischen den theoretisch bestimmten und den tatsächlich gemessenen Luftfeuchtwerten im Wesentlichen auf Wandabsorptionseffekte zurückzuführen und unabhängig von der Pollenexposition selbst. Sie wurde deshalb schon bei der Einstellung der relativen Luftfeuchtigkeit während des Versuchsablaufes berücksichtigt.

Neben den Untersuchungen zum Einfluß der relativen Luftfeuchte auf die Proteinfreisetzung konnte in Immunoblots kein Einfluß von relativer Luftfeuchtigkeit und Allergenfreisetzung festgestellt werden. Dies gilt sowohl für die *Aqua bidest.*- als auch für AC-Puffer-Extrakte.

Ein modulierender Einfluß der relativen Luftfeuchte auf die Qualität und Quantität der Allergenfreisetzung konnte für alle untersuchten Pollenarten mit den in dieser Arbeit angewendeten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Vergleicht man die in dieser Arbeit erhobenen Daten mit denjenigen von FRITZSCHE *et al.* [39], die in derselben Expositionsanlage und mit ähnlichem Versuchsprotokoll für Pollen des Wiesenlieschgrases erhoben wurden, so läßt sich ein ähnlicher Einfluß der relativen Luftfeuchte auf die Proteinfreisetzung beobachten. Der von Fritzsche *et al.* [38] beschriebene zeitabhängige Verlust des Majorallergenes Phl p 1 bei hoher relativer Luftfeuchte von 80 % aus Wiesenlieschgraspollen ließ sich für keines der Majorallergene der in dieser Arbeit untersuchten Pollen nachvollziehen.

## 5.2 Einfluß von Schwefeldioxid auf die Exposition von Pollen bei relativen Luftfeuchten von 0 – 80 % rF

Im Wirbelschichtreaktor wurden Honiggraspollen mit Schwefeldioxidkonzentrationen zwischen 20 und 13100  $\mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$  (0,0076 bis 5 ppm  $\text{SO}_2$ ) bei relativen Luftfeuchten zwischen 0 und 80 % für bis zu 9 Stunden Dauer exponiert. Dabei konnte ein Einfluß der Schwefeldioxidkonzentration auf den Proteingehalt der Extrakte festgestellt werden: Die negative Korrelation zwischen relativer Luftfeuchte und der aus Pollen extrahierbaren Proteinmenge war um so weniger ausgeprägt, je höher die  $\text{SO}_2$ -Konzentration eingestellt wurde.

Besonders deutlich war dieser Effekt bei Extraktion mit AC-Puffer feststellbar.

Wie bereits für den Einfluß von der relativen Luftfeuchte gezeigt, führte auch  $\text{SO}_2$  zu keiner qualitativen oder semiquantitativen Alteration des Allergenmusters für die schwefeldioxidexponierten Honiggraspollen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den von BEHRENDT *et al.* [12] für schwefeldioxidexponierte Pollen des Wiesenlieschgrases erhobenen Daten, so fällt auf, daß die für das Wiesenlieschgras beobachtete signifikante, zeitabhängige Reduktion des Majorallergens Phl p 5 nicht beim Honiggras nachweisbar war. Die eingesetzte Schwefeldioxidkonzentration lag allerdings mit 16500  $\mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$  deutlich über der in dieser Arbeit verwandten Schadgaskonzentration. FRITZSCHE *et al.* [38] fanden auch an  $\text{SO}_2$ -exponierten Wiesenlieschgraspollen eine zeitabhängige Reduktion des Proteingehaltes der Extrakte, die für Luftfeuchten von 0, 50 und 80 % galt und die in dieser Arbeit nicht gefunden wurde.

Auch RUFFIN *et al.* [103; 104] führten Experimente zum Einfluß gasförmiger Schadstoffe ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$  und  $\text{CO}$ ) auf Pollen verschiedener Bäume (*Ulmus pumila*, *Quercus rubra*, *Pinus taeda*, *Festuca elatior*) durch und untersuchten deren Extrakte tierexperimentell, mittels Immunodiffusion und Histamin-Release-Test an basophilen Leukozyten. Die Untersuchungen zeigten elektrophoretisch nachweisbar ein verändertes Bandenmuster sowie im Histamin-Release-Test eine verminderte Histaminfreisetzung nach  $\text{SO}_2$ -Exposition der Pollen der Art *Quercus rubra*.

Bei der Bewertung dieser Arbeiten muß jedoch die sehr hohe Konzentration des Schadgases von 1 % (= 10.000 ppm) berücksichtigt werden. Sie lag um den Faktor 2.000 höher als die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Schwefeldioxidkonzentration von 5 ppm, wodurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt ist. Auch kann bei RUFFIN *et al.* [103; 104] nicht von einer gleichmäßigen Exposition ausgegangen werden, da die Pollen aufgrund der Bauart der verwandten Expositions-kammer keiner Verwirbelung ausgesetzt waren. THOMAS *et al.* [128; 129] führten Pollenexpositionsversuche durch, bei denen die Pollen *Secale cereale*, *Betula alba* und *Fraxinus pennsylvanica* sowohl vermehrt Protein freisetzen, als auch stärkere Reaktivitäten im Histamin-Release-Test und im Haut-Pricktest festgestellt werden konnten, wenn die Pollen mit 900 ppb SO<sub>2</sub> exponiert worden waren. Auch bei der für diese Arbeiten eingesetzten Expositionsanlage kann nicht von einem gleichmäßigen Schadgaskontakt aller Pollen ausgegangen werden, da keine Wirbelschicht erzielt werden konnte. Dies schränkt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die natürlichen Bedingungen während des Pollenflugs *in vivo* ein.

Der von anderen Autoren (FRITZSCHE *et al.*, RUFFIN *et al.* und THOMAS *et al.*) festgestellte Einfluß von Schwefeldioxid auf die Allergenität von Pollen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden.

In dieser Arbeit ist der Effekt von Schwefeldioxid auf Honiggraspollen auf die Proteinfreisetzung beschränkt und besteht in einer Reduktion des Einflusses der relativen Luftfeuchte, welche negativ mit dem Proteingehalt der Extrakte korreliert ist. Sieht man die Abhängigkeit zwischen Luftfeuchte und Proteinfreisetzung als Funktion der empfindlichen hydromechanischen Regelprozesse am Pollen [39; 46], so wäre eine Reduktion dieses Effektes durch Schwefeldioxid im Sinne einer schadgasbedingten Schädigung pollenphysiologischer Vorgänge zu interpretieren. Diese Annahme wird durch BOSAC *et al.* [16] bestätigt, die zeigen konnten, daß eine Exposition von Pollen mit 200 nl SO<sub>2</sub>/l zu einem deutlichen Effekt auf pollenphysiologische Vorgänge führt, nämlich zu verringerter Keimungsfähigkeit und reduziertem Pollenschlauchwachstum. Bemerkenswerterweise zeigte sich dieser Effekt jedoch nur an Pollen, welche in ungepuffertem, wässrigem Medium inkubiert wurden und nicht jedoch an Pollen, welche in trockenem Zustand dem

Schadgas ausgesetzt wurden [16]. Dieses Ergebnis unterstreicht abermals die Bedeutung hydrodynamischer Einflüsse auf pollenphysiologische Prozesse.

### 5.3 Beurteilung der Befunde in Hinblick auf natürliche Bedingungen während des Pollenfluges

Für Pollen der frühblühenden Bäume Hasel, Erle und Birke konnte keine signifikante Korrelation von extrahierbarer Proteinmenge und relativer Luftfeuchte festgestellt werden. Dagegen fand sich für die später im Jahresverlauf blühenden Pflanzen Honiggras und Beifuß eine signifikante negative Korrelation für diese Parameter. Zur Beurteilung der erhobenen Befunde in Hinblick auf natürliche Umweltbedingungen wurden diese mit den Daten des Pollenflugkalenders (vgl. *Abbildung 1.4-1*) und den während der Flugzeit bestehenden meteorologischen Bedingungen [79; 82] in Relation gesetzt. Ein Pollenflug kann für Hasel, Erle und Birke bereits im Januar gemessen werden, obwohl als Hauptblühzeit erst die Monate März bzw. April angegeben werden [123]. Beim Flug während der Frühjahrsmonate sind die Pollen niedrigeren Temperaturen und höheren relativen Luftfeuchten ausgesetzt als Honiggras- und Beifußpollen, die erst in den Sommermonaten vorkommen [82]. Möglicherweise sind die Pollen der Frühblüher an hohe Luftfeuchten angepaßt und fliegen bereits bei 70 bis 80 % rF [79], ohne Pollenproteine an die Außenluft abzugeben. Die Pollen von Honiggras und Beifuß hingegen werden in der Regel in den Sommermonaten weniger hohen relativen Luftfeuchten zwischen 40 % und 50 % rF ausgesetzt [79]. Kommt es dennoch in der Gräserpollenflugzeit zu einem starken Anstieg der relativen Luftfeuchte, so ist eine verstärkte Allergenfreisetzung durch Wechselwirkung mit kleinsten Wassertröpfchen möglich [94]. Im zeitlichen Zusammenhang mit Gewitterstürmen konnte in Melbourne, Australien, ein epidemieartiges Auftreten von Asthmaanfällen beobachtet werden. Dieser Zusammenhang konnte mit einer verstärkten Freisetzung von allergenem Material aus den Pollen durch Regenwasserkontakt und nachfolgender Ruptur durch osmotischen Schock erklärt werden [14; 69; 126]. Da bei den beschriebenen Gewitterstürmen auch hohe

relative Luftfeuchten bestanden [69], ist ergänzend eine bereits vor der Ruptur der Pollen einsetzende gesteigerte Proteinfreisetzung im Sinne des in dieser Arbeit beschriebenen Effektes möglich.

#### **5.4. Allergologische Relevanz der Befunde**

##### *Relative Luftfeuchte*

Wie bereits einleitend erwähnt, stellen Allergien der Atemwege ein großes Gesundheitsproblem in Deutschland dar [121]. Auch weltweit steigt die Prävalenz allergischer Erkrankungen, wie viele epidemiologische Studien zeigen konnten [99; 140; 141]. In diesem Zusammenhang sind Kenntnisse über Zeiten hoher Allergenbelastung und mögliche Vermeidungsstrategien für einen großen Kreis von Betroffenen äußerst wichtig.

Die verfügbaren Informationen über den Pollenflug korrelieren nicht immer mit der tatsächlichen Allergenbelastung, wie bereits anhand von Messungen der atmosphärischen Allergenkonzentration gezeigt werden konnte [94, 109, 119]. Dabei konnte eine Abhängigkeit der Allergenbelastung [94; 109] bzw. klinischer Symptome [14; 69; 126] von meteorologischen Faktoren festgestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Abhängigkeit von Proteinfreisetzung aus Pollen und der relativen Luftfeuchte gibt Hinweise auf die Bedeutung meteorologischer Einflußgrößen für die atmosphärische Allergenkonzentration und könnte - ergänzt um klinische Expositionsstudien - die Grundlage neuer Empfehlungen zur Allergenvermeidung für Betroffene darstellen.

##### *Schwefeldioxid*

Wie in großen epidemiologischen Studien [71, 72, 73; 88; 89] gezeigt werden konnte, sind hohe Schwefeldioxidkonzentrationen in der Atemluft nicht mit einer gesteigerten Prävalenz an allergischen Erkrankungen des Respirationstraktes korreliert. Mit diesen Befunden stimmen auch die hier erhobenen Daten überein, die keine Hinweise auf eine gesteigerte Allergenität von Pollenallergenen nach

SO<sub>2</sub>-Exposition geben. Der festgestellte Einfluß Schwefeldioxids auf die von der relativen Luftfeuchte abhängige Proteinfreisetzung aus Pollen ist für das Verständnis pollenphysiologischer Prozesse von Bedeutung, jedoch ohne direkte allergologische Relevanz.

Relevant in Bezug auf allergische Erkrankungen scheinen dagegen eher hohe Konzentrationen an NO<sub>2</sub>, Ozon und partikulären Luftschadstoffen, wie D'Amato [25] in einer kürzlich erschienenen Arbeit erneut betonte.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Pollen von Hasel, Erle, Birke, Honiggras und Beifuß bei relativen Luftfeuchten von 0 bis 80 % rF in einem Wirbelschichtreaktor für 9 Stunden gegenüber synthetischer Luft exponiert. Weiterhin wurden Honiggraspollen ebenfalls im Wirbelschichtreaktor über die gleiche Zeitdauer und das gleiche Spektrum an relativen Luftfeuchten gegenüber Schwefeldioxid in den Konzentrationen von 20 bis 13100  $\mu\text{g SO}_2/\text{m}^3$  (0,0076 bis 5 ppm) exponiert.

Es konnte gezeigt werden, daß für Pollen von Honiggras und Beifuß eine signifikante zeitabhängige negative Korrelation zwischen der relativen Luftfeuchte und der aus den Pollen extrahierbaren Proteinmenge besteht. Dieser Effekt trat ausschließlich bei trinukleären Pollen auf, da sie im Gegensatz zu den binukleären Pollenarten (Hasel, Erle und Birke) besonders sensibel auf hydrodynamische Veränderungen reagieren.

Weder auf immunbiochemischer Ebene (Pollenallergene) noch licht- oder rasterelektronenmikroskopisch (Pollen-Morphologie) konnten expositionsabhängige Veränderungen festgestellt werden.

Die Exposition gegenüber Schwefeldioxid führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der negativen Korrelation zwischen relativer Luftfeuchte und aus Honiggraspollen extrahierbarem Protein. Dieser Effekt war um so deutlicher ausgeprägt, je höher die Konzentration des Schwefeldioxids eingestellt wurde (bis zu 5 ppm  $\text{SO}_2$ ) und zeigte sich für 6 und 9 Stunden Exposition und Extraktion mit *Aqua bidest.* und AC-Puffer. Möglicherweise ist diese Beobachtung durch eine schadgasbedingte Schädigung pollenphysiologischer Prozesse zu erklären.

Anhand des Nachweises einer Beeinflussung der Proteinfreisetzung aus Pollen durch die relative Luftfeuchte ergeben sich Hinweise auf die Bedeutung meteorologischer Parameter für Allergenkonzentrationen in der Atmosphäre.

Dieser Befund könnte - ergänzt um klinische Expositionsstudien - die Grundlage neuer Empfehlung zur Allergenvermeidung für Betroffene darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. ÄDA (Ärzteverband Deutscher Allergologen)  
Blickpunkt Allergie: ÄDA und DGAI treten gemeinsam an die Öffentlichkeit.  
Allergo J. 7 (1998) 406
2. Andrae, S., Axelson, O., Björkstén, B., Fredriksson, M., Kjellman, N.-I.M.  
Symptoms of bronchial hyperreactivity and asthma in relation to  
environmental factors.  
Arch. Dis. Childh. 63 (1988) 473-478
3. Batteiger, B., Newhall, W.J., Jones, R.B.  
The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of  
proteins transferred to nitrocellulose membranes.  
J. Immunol. Meth. 55 (1982) 297-307
4. Becker, W.-M., Schaubschläger, Westphal, W., Schlaak, M.  
Purification of grass pollen allergens by means of immobilized monoclonal  
antibodies.  
In: "Biochemical engineering",  
Chmiel, H., Hammes, W.P. (Hrsg.),  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1988) 440
5. Becker, W.-M., Bufe, A., Petersen, A., Schlaak, M.  
Molecular characterisation of timothy grass pollen group V allergens.  
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 107 (1995) 242-244

6. Behrendt, H., Friedrichs, K.H., Darsow, U., Kainka-Stänicke, E., Becker, W.-M., Tomingas, R.  
Allergens and pollutants in the air - A complex interaction.  
In: "New Trends in Allergy III",  
Ring, J., Przybilla, B. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1991) 467-478
7. Behrendt, H., Becker, W.-M., Friedrichs, K.H., Darsow, U., Tomingas, R.  
Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 99 (1992) 425-428
8. Behrendt, H.  
Allergotoxikologie: Ein Forschungskonzept zur Untersuchung des Einflusses von Umweltschadstoffen auf die Allergieentstehung.  
In: „Allergieforschung: Probleme, Strategien und klinische Relevanz“,  
Ring, J. (Hrsg.)  
MMV Medizin-Verlag, München (1992) 123-130
9. Behrendt, H., Friedrichs, K.-H., Krämer, U., Hitzfeld, B., Becker W.-M., Ring, J.  
The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases.  
Prog. Allergy Clin. Immunol. 3 (1995) 83-89
10. Behrendt, H.  
Umwelteinflüsse und Allergie.  
Allergo J. 4 (1995) 455

11. Behrendt, H., Ring, J.  
A research strategy for the investigation of the influence of environmental pollutants on the development of allergic sensitization and disease.  
In: "New Trends in Allergy IV",  
Ring, J.; Behrendt, H.; Vieluf, D. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1997) 51-60
  
12. Behrendt, H., Becker, W.-M., Fritzsche, C., Sliwa-Tomczok, W., Tomczok, J., Friedrichs, K.H., Ring, J.  
Air pollution and allergy: Experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 113 (1997) 69-74
  
13. Behrendt, H., Tomczok, J., Sliwa-Tomczok, W., Kasche, A., Ebner v. Eschenbach, C., Becker, W.-M., Ring, J.  
Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 118 (1999) 414-418
  
14. Bellomo, R., Gigliotti, A., Treloar, A., Holmes, P., Suphioglu, C., Singh, M.B., Knox, R.B.  
Two consecutive thunderstorm associated epidemics of asthma in the city of Melbourne.  
Med. J. Austr. 156 (1992) 834-837
  
15. Berggren, B., Nilsson, S., Boethius, G.  
Diurnal variation of airborne birch pollen at some sites in Sweden.  
Grana 34: 251-259 (1995)

16. Bosac, C., Black, V.J., Black, C.R., Roberts, J.A., Lockwood, F.  
Impact of O<sub>3</sub> and SO<sub>2</sub> on reproductive development in oilseed rape (*Brassica napus L.*). I. Pollen germination and pollen tube growth.  
New Phytol. 124 (1993) 439-446
17. Boubel, R.W. Fox, D.L.; Turner, D.B., Stern, A.C.  
Fundamentals of air pollution.  
Academic Press, San Diego (1994) 3.Aufl.
18. Brown, H.M., Irving, K.R.  
The size and weight of common allergenic pollen.  
Acta Allergol. 28 (1973) 132-137
19. Bufe, A., Becker, W.-M., Schramm, G., Petersen, A., Mamat, U., Schlaak, M  
Major allergen Phl p Va (timothy grass) bears at least two different IgE-reactive epitopes.  
J. Allergy Clin. Immunol. 94 (1994) 173-181
20. Bufe A., Schramm, G., Keown, M.B., Schlaak M., Becker, W.-M.  
Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase.  
FEBS Letters 363 (1995) 6-12
21. Burr, M.L., Butland, B.K., King, S., Vaughan-Williams, E.  
Changes in asthma prevalence: two surveyes 15 years apart.  
Arch. Dis. Child. 64 (1989) 1452-1456
22. Cadot, P., Lejoly, M., Van Hoeyveld, E.M., Stevens, E.A.M.  
Influence of the pH of the extraction medium on the composition of birch (*Betula verrucosa*) pollen extracts.  
Allergy 50 (1995) 431-437

23. Comtois, P.  
The experimental research of Charles H. Blackley.  
*Aerobiologica* 11 (1995) 63-68
  
24. D'Amato, G., Spieksma, F.Th.M., Liccardi, G., Jäger, S., Russo, M, Kontou-Fili, K., Nikkels, H., Wüthrich, B., Bonini, S.  
Pollen-related allergy in Europe.  
*Allergy* 53 (1998) 567-578
  
25. D'Amato, G.  
Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy.  
*Clin. Exp. Allergy* 30 (2000) 628-636
  
26. Darsow, U.  
Wirkung von atmosphärischen Schwebstäuben auf Morphologie und allergene Eigenschaften von Gräserpollen (*Dactylis glomerata*) in vitro.  
Dissertation  
Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf (1992)
  
27. Devalia, J., Bayram, H., Ruznak, C., Calderon, M., Sapsford, R.J., Abdelaziz, M.A., Wang, J., Davies, R.J.  
Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vitro studies in the upper and lower airways.  
*Allergy* 52 (1997) 45-51
  
28. Dickinson, H.G., Lewis, D.  
Cytochemical and ultrastructural differences between intraspecific compatible and incompatible pollinations in *Raphanus*.  
*Proc. R. Soc. London Ser. B.* 183 (1973) 21-38

29. Dickinson, H.G., Lewis, D.  
Interactions between the pollen grain coating and the stigmatic surface during compatible and incompatible intraspecific pollinations in *Raphanus*.  
Proc. R. Soc. London Ser. B. 183 (1973) 21-38
30. Dickinson, H.G., Lewis, D.  
The formation of the tryphine coating of the pollen grains of *Raphanus* and its properties relating to the self-incompatibility system.  
Proc. R. Soc. London Ser. B. 184 (1973) 149-165
31. DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft)  
MAK- und BAT-Werte-Liste 1998.  
Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe  
Wiley-VCH, Weinheim, Mitteilungen 34 (1998) 9, 96
32. Duhme, H., Weiland, S.K., Keil, U.  
The association between self-reported symptoms of asthma and allergic rhinitis and self-reported traffic density on street of residence in adolescence.  
Epidemiology 7 (1996) 578-582
33. Edwards, J., Walters, S., Griffiths, R.K.  
Hospital admissions for asthma in preschool children: Relationship to major roads in Birmingham, United Kingdom.  
Arch. Envir. Health. 49 (1994) 223-227
34. Ehrendorfer, F.  
Spermatophyta-Angiospermae.  
In: „Lehrbuch der Botanik“,  
Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A.F.W. (Begr.),  
Denffer, D.v., Ehrendorfer, F., Mägdefrau, K., Ziegler, H. (Hrsg.),  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1978) 31. Aufl. 777-833

35. Elleman, C.J., Dickinson, H.G.  
Pollen-Stigma Interactions in Brassica.  
J. Cell Sci. 80 (1986) 141-157
36. Emberlin, J.  
Plant allergens on pauci-micronic airborne particles.  
Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 202-205
37. England, J., Ulbricht, H.  
Flugmeteorologie.  
Transpress, Berlin (1990) 72-74
38. Fritzsche, C., Becker, W.-M., Behrendt, H.  
A method for investigating the effects of gaseous pollutants on pollen  
ultrastructure and allergen release.  
In: "New Trends in Allergy IV",  
Ring, J.; Behrendt, H.; Vieluf, D. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1997) 101-103
39. Fritzsche, C., Becker, W.-M., Behrendt, H.  
Exposure chamber for pollen to gaseous pollutants.  
Allergy 50 (1995) 51 (abstract)
40. Fritzsche, C., Huss, J., Becker, W.-M., Behrendt, H.  
Ultrastructural and molecular investigations on the interaction of air pollutants  
and allergen carriers. 2. Effects of air humidity, sulfur dioxide and nitrogen  
dioxide.  
In: "Research Report FZKA-PUG 22",  
Horsch, F., Friebel P., Seidel, A., Wiebel, A. (Hrsg.),  
Forschungszentrum Karlsruhe (1996) 95-106

41. Galan, C., Emberlin, J., Dominguez, E., Bryant, R.H., Villamandos, F.  
A comparative analysis of daily variations in the Gramineae pollen counts at  
Cordoba, Spain and London, UK.  
Grana 34 (1995) 189-198
42. Geldart, D.  
Powder Technologie 7 (1973) 285-292
43. Gilissen, L.J.W.  
The influence of relative humidity on the swelling of pollen grains *in vitro*.  
Planta 137 (1977) 299-301
44. Glassheim, J.W., Ledoux, R.A., Vaughan, T.R., Damiano, M.A., Goodman,  
D.L., Nelson, H.S., Weber, R.W.  
Analysis of meteorologic variables and seasonal aeroallergen pollen counts  
in Denver, Colorado.  
An. Allergy Asth. Immunol. 75 (1995) 149-156
45. Goding, J.W.  
Monoclonal antibodies: principles and practice.  
Academic Press, London (1983) 2. Aufl.
46. Haahtela, T., Lindholm, H., Björkstén, F., Koskinen, S., Laitinen, L.A.  
Prevalence of asthma in Finnish young men.  
Brith. Med. J. 301 (1990) 266-268
47. Hancock, K., Tsang, V.C.W.  
India Ink staining proteins on nitrocellulose paper.  
An. Biochem. 133 (1983) 157-162

48. Henry, L.R., Abramson, R., Adler, J.A., Wlodarczyk, J., Hensley, M.J.  
Asthma in the vicinity of power stations. I. Prevalence study.  
*Pediatr. Pulmonol.* 11 (1991) 127-133
49. Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Knox, R.B., Howlett, B.J.  
Pollen-wall proteins: "ametophytic" and "sporophytic" fractions in the pollen walls of the *Malvaceae*.  
*An. Bot. London* 37 (1973) 403-412
50. Heslop-Harrison, J., Knox, R.B., Heslop-Harrison, Y.  
Pollen-wall proteins: exine-held fractions associated with the incompatibility response in *Cruciferae*.  
*Theor. Appl. Genet.* 44 (1974) 133-137
51. Heslop-Harrison, J., Knox, R.B., Heslop-Harrison, Y., Mattsson, O.  
Pollen-wall proteins: emission and role in incompatibility response.  
*Biol. J. Linn. Soc.* 7 (Suppl 1) (1975) 189-202
52. Heslop-Harrison, J.  
An interpretation of the hydrodynamics of pollen.  
*Am. J. Bot.* 66 (1979) 737-743
53. Hjelmroos, M.  
Evidence of long-distance transport of *Betula* pollen.  
*Grana* 30 (1991) 215-228
54. Hoekstra, F.A., Bruinsma, J.  
Respiration and vitality of binucleat and trinucleat pollen.  
*Physiol. Plant.* 34 (1975) 221-225

55. Hoekstra, F.A., Bruinsma, J.  
Protein synthesis of binucleate and trinucleate pollen and its relationship to tube emergence and growth.  
*Planta* 146 (1979) 559-566
  
56. Howlett, B.J., Knox, R.B., Heslop-Harrison, J.  
Pollen-wall proteins: release of the allergen antigen E from intine and exine sites in pollen grains of ragweed and *Cosmos*.  
*J. Cell Sci.* 13 (1973) 603-619
  
57. Howlett, B.J., Knox, R.B., Paxton, J.D., Heslop-Harrison, J.  
Pollen-wall proteins: physicochemical characterization and role in self-incompatibility in *Cosmos bipinnatus*.  
*Proc. R. Soc. London. Ser. B.* 188 (1975) 167-182
  
58. Ishizaki, T., Koizumi, K., Ikemori, R., Ishiyama, Y., Kushibiki, E.  
Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area.  
*An. Allergy* 58 (1987) 265-270
  
59. Ito, K., Hayes, C.  
Associations of London, England, daily mortality with particulate matter, sulfur dioxide and acidic aerosol pollution.  
*Arch. Environ. Health* 48 (1993) 213-220
  
60. Iwanami, Y., Sasakuma, T., Yamada, Y.  
Pollen: Illustrations and Scanning Electromicrographs.  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1988)

61. Jörres, R., Magnussen, H.  
Airway response of asthmatics after 30 min exposure, at resting ventilation,  
to 0.25 ppm NO<sub>2</sub> or 0.5 ppm SO<sub>2</sub>.  
Eur. Resp. J. 3 (1990) 132-137
62. Jörres, R., Nowack, D., Magnussen, H.  
Die Wirkung der Einatmung von Ozon auf die allergische Reaktion des  
Bronchialsystems.  
In: „Forschungsbericht FZK-PUG 19“,  
Forschungszentrum Karlsruhe (1995)
63. Kauppinen, E.I., Jäppinen, A.V.K., Hillamo, R.E., Rantio-Lehtimäki, A.,  
Koivikko, A.S.  
A statistic particle size selective bioaerosol sampler for the ambient  
atmosphere.  
J. Aerosol Sci. 20 (1989) 829-838
64. Kersten, W., Puls, K.E.  
Pollenflug-Vorhersage.  
Allergologie 7 (1984) 81-114
65. Khyse-Andersen, J.  
Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for  
rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose.  
J. Biochem. Biophys. Meth. 10 (1984) 203-209
66. Knox, R.B., Willing, R.R., Ashford, A.E.  
Role of pollen-wall proteins as recognition substances in interspecific  
hybridization in poplars.  
Nature 237 (1972) 381-383

67. Knox, R.B.  
Pollen and Allergy.  
In: "Studies in Biology",  
The Institut of Biology (Hrsg.),  
Edward Arnold Verlag, London; 107 (1979) 1, 23-32, 51
68. Knox, R.B.  
The Pollen Grain.  
In: "Embryology of Angiosperms",  
Johri, B.M. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1984) 197-271
69. Knox, R.B.  
Grass pollen, thunderstorms and asthma.  
Clin. Exp. Allergy 23 (1993) 354-359
70. Knox, R.B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H.C., Peng, J.L.,  
Bursill, L.A.  
Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles:  
Implications for asthma and air pollution.  
Clin. Exp. Allergy 27 (1997) 246-251
71. Krämer, U., Behrendt, H., Dolgner, R., Willer, H., Schlipkötter, H.-W.  
Impact of SO<sub>2</sub> and TSP on allergic manifestations and non-allergic  
respiratory diseases – Results from the study on school-beginners in East  
and West Germany 1991 – 1993.  
In: "New Trends in Allergy IV",  
Ring, J.; Behrendt, H.; Vieluf, D. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1997) 43-47

72. Krämer, U. Behrendt, H., Ring, J.  
Air pollution as risk factor for allergy: The East-West German Experience.  
In: "New Trends in Allergy IV",  
Ring, J.; Behrendt, H.; Vieluf, D. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1997) 25-35
73. Krämer, U., Behrendt, H., Dolgner, R., Oppermann, H., Ranft, U., Ring, J.,  
Schlipkötter, H.-W.  
Prävalenz von Atemwegserkrankungen, Allergie und Sensibilisierung.  
Allergologie 22 (1999) 27-37
74. Krämer, U., Koch, T., Ranft, U., Ring, J., Behrendt, H.  
Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban  
areas.  
Epidemiology 11 (2000) 64-70
75. Kunz, B., Ring, J.  
Are Allergies Increasing?  
In: "New Trends in Allergy III",  
Ring, J., Przybilla, B. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1991)
76. Laemmli, U.K.  
Cleavage of structural proteines during assembly of the head of  
bacteriophage T4.  
Nature 227 (1970) 680-685
77. Liem, A.S.  
Dispersal and morphology of grass pollen at Schiermonnikoog (The  
Netherlands).  
Rev. Palaeobotany Palynology 4 (1967) 287

78. Liem, A.S., Groot, J.  
Anthesis and pollen dispersal of *Holcus lanatus* L. and *Festuca rubra* L. in relation to climate factors.  
Rev. Palaeobotany Palynology 15 (1973) 3
79. Liljequist, G.H., Cihak, K.  
Allgemeine Meteorologie.  
Viebeg Verlag, Braunschweig, 1984
80. Luttmann, H., Grömping, U., Kreienbrock, L.  
Kohortenstudie zu Atemwegserkrankungen und Lungenfunktion bei Schulkindern in Südwestdeutschland. Teil 4. Innerstädtische Umwelteinflüsse auf Atemwegserkrankungen in Mannheim.  
Zentralblatt Hyg. Umweltmed. 196 (1994) 114-138
81. Magnussen, H., Jörres, R., Wagner, H.M., Nieding, G.v.  
Relationship between the airway response to inhaled sulfur dioxide, isocapnic hyperventilation and histamine in asthmatic subject.  
Int. Arch. Occup. Environ. Health 62 (1990) 485-491
82. Mandrioli, P., Negrini, M.G.  
Weather and climate in Europe.  
In: "Allergenic Pollen and Pollinosis in Europe",  
D'Amato, G., Spiekma, F.T.M., Bonini, S. (Hrsg.),  
Blackwell Verlag, Oxford, Boston, Berlin (1991) 3-17
83. Messer Griesheim  
Gase-Handbuch  
Messer Griesheim, Düsseldorf (1998) 3. Auflage 10-28, 121-126

84. Miyamoto, T.  
Epidemiology of pollutioninduced airway disease in Japan.  
Allergy 52 (Suppl. 38) (1997) 30-36
85. MURL (Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen)  
Pilotstudie "Allergie", Wirkungskataster zu den Luftreinhalteplänen Rheinschiene Süd und Rheinschiene Mitte.  
MURL, Düsseldorf (1990) 157-189
86. Molerus, O.  
Fluid-Feststoff-Strömungen.  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1982)
87. Mullins, J., White, J., Davies, B.H.  
Circadian periodicity of grass pollen.  
An. Allergy 57 (1986) 371-374
88. Mutius, E.v., Fritzschn, C., Weiland, S.K.  
Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: A descriptive comparison.  
Brit. Med. J. 305 (1992) 1395-1399
89. Mutius, E.v., Martinez, F.D., Fritzschn, C., Nicolai, T., Roell, G., Thiemann, H.-H.  
Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany.  
Am. J. Crit. Care. Med. 149 (1994) 358-364
90. Mutius, E.v., Weiland, S.K., Fritzschn, C.  
Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany.  
Lancet 351 (1998) 862-866

91. Nilsson, S., Praglowski, J., Nilsson, L.  
Atlas of Airborne Pollen Grains and Spores in Northern Europe.  
Natur och Kultur Bokförlaget, Stockholm (1977)
92. Osterlee, A., Drijver, M., Lebret, E., Brunnekreef, B.  
Chronic respiratory symptoms in children and adults living along streets with  
high traffic density.  
Occup. Environ. Med. 53 (1996) 241-247
93. Peat, J.K., van den Berg, R.H., Green, W.F., Mellis, C.M., Leeder, S.R.,  
Woolcock, A.J.  
Changing prevalence of asthma in Australian children.  
Brit. Med. J. 308 (1994) 1591-1596
94. Pehkonen, E., Rantio-Lehtimäki, A.  
Variations in airborne pollen antigenic particles caused by meteorologic  
factors.  
Allergy 49 (1994) 472-477
95. Pershagen, G., Rylander, E., Norberg, S., Eriksson, M., Nordvall, S.L.  
Air pollution involving nitrogen dioxide exposure and wheezing bronchitis in  
children.  
Int. J. Epidemiol. 24 (1995) 1147-1153
96. Petersen, A., Schramm, G., Becker, W.-M., Schlaak, M.  
Comparison of four grass pollen species concerning their allergens of grass  
group V by 2D immunoblotting and microsequencing.  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374 (1993) 855-861
97. Pirquet, C.v.  
Allergie.  
Münch. Med. Wochenschr. 30 (1906) 1457-1458

98. Rantio-Lehtimäki, A., Viander, M., Coivikko, A.  
Airborne birch pollen antigens in different particle sizes.  
Clin. Exp. Allergy 24 (1994) 23-28
99. Ring, J.  
Epidemiologie allergischer Erkrankungen.  
MMV Medizin Verlag, München (1991)
100. Ring, J.  
Angewandte Allergologie.  
MMV Medizin Verlag, München (1991), 68-75
101. Roedel-Drevet, P., Digonnet, C., Matthys-Rochon, E., Chamiat, D., Dumas, C.  
Fertility of *Zea mays* pollen during dehydration: physiological steps outlined by nucleotide measurements.  
Plant. Physiol. Biochem. 33 (1995) 289-294
102. Rossi, O.V.J., Kinnula, V.L., Tienari, J., Huhti, E.  
Association of severe asthma attacks with weather, pollen, and air pollution.  
Thorax 48 (1993) 244-248
103. Ruffin, J., Evans, V., Banerjee, S., Benerjee, U.  
A preliminary study of the allergenicity of red oak *Quercus rubra* pollen extract after contamination with some common atmospheric pollutants (e. g. NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and CO).  
J. Palynol. 20 (1984) 17-30

104. Ruffin, J., Liu, M.Y.G., Sessoms, R., Banerjee, S., Benerjee, U.  
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 46 (1986) 119-129
105. Rusznak, C., Devalia, J.L., Davies, R.L.  
The impact of pollution on allergic disease.  
Allergy 49 (1994) 21-27
106. Sato, K., Nakazawa, T., Sahashi, N., Kochibe, N.  
Early and seasonal changes of specific IgE to japanese cedar pollen in a young population.  
An. Allergy Asth. Immunol. 79 (1997) 57-61
107. Schäfer, T., Vieluf, D., Behrendt, H.  
Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany.  
Allergy 51 (1996) 532-539
108. Schäfer, T., Krämer, H., Behrendt, H., Kunz, B., Überla, K., Vieluf, D, Ring, J.  
Epidemiology of atopic eczema.  
In: "New Trends in Allergy IV",  
Ring, J., Behrendt, H., Vieluf, D. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1997) 21-23
109. Schäppi, G.F., Suphioglu, C., Taylor, P.E., Knox, R.B.  
Concentrations of the major birch pollen tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable particles in the atmosphere.  
J. Allergy Clin. Immunol. 100 (1997) 656-661

110. Schramm, G.  
Identifizierung IgE-reaktiver Epitope des Honiggrases (*Holcus lanatus*).  
Dissertation  
Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität  
Bayreuth (1995)
111. Schramm, G., Petersen, A., Bufe, A., Schlaak, M., Becker, W.-M.  
Identification and characterisation of the major pollen allergens of velvet  
grass (*Holcus lanatus*), Hol I 1 and Hol I 5.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 110 (1996) 354-363
112. Schubert, R., Wagner, G.  
Botanisches Wörterbuch  
UTB-Verlag, Stuttgart (1993) 11. Aufl. 397
113. Schultz Larsen, F., Holm, N.V., Henningsen, K.  
Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population based twin  
sample.  
J. Am. Acad. Dermatol. 15 (1986) 487-494
114. Schupp, A., Kaaden, R., Islam, M.S.  
Einfluß verkehrsbedingter Immissionen auf die Empfindlichkeit der  
Atemwege bei Kindern in Duisburg.  
Allergologie 12 (1994) 591-597
115. Shaw, G.  
The chemistry of sporopollonien.  
In: "Sporopollenin",  
Brooks, J.; Grant, P.R.; Muir, M.; van Gijssel, P., Shaw, G. (Hrsg.),  
Academic Press, London, New York (1971) 305-350

116. Shou, C.  
Allergens in rhinitis: B- and T-cell epitopes of allergen molecules.  
Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 10-14
117. Solomon, W.R.  
Aerobiology of pollinosis.  
J. Allergy Clin. Immunol. 74 (1984) 449-461
118. Spieksma, F.T.M.  
Aerobiology of inhalatory allergen carriers.  
Allergol. Immunopathol. 23 (1995) 20-23
119. Spieksma, F.Th.M., Nikkeles, B.H., Dijkman, J.H.  
Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration.  
Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 234-239
120. SRU (Rat von Sachverständigen für Umweltfragen)  
Umweltgutachten 1998  
Verlag Metzler-Poeschel, Stuttgart (1998)
121. SRU (Rat von Sachverständigen für Umweltfragen)  
Umwelt und Gesundheit, Risiken richtig einschätzen. Sondergutachten.  
Verlag Metzler-Poeschel, Stuttgart (1999) 107-117, 130-137
122. Stanley, R.G., Linsken, H.F.  
Pollen: Biologie, Biochemie, Gewinnung und Verwendung.  
Urs Freund Verlag, Greifenberg (1985) 1-34, 188-205

123. Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst  
Gesamtdeutscher Pollenflugkalender (1992-1994).  
Burgstraße 12, 33175 Bad Lippspringe
124. Studnicka, M., Hackl, E., Pischinger, J., Fangmeyer, C., Haschke, N., Kuhr, J., Urbanek, R., Neumann, M., Frischer, T.  
Traffic-related NO<sub>2</sub> and the prevalence of asthma and respiratory symptoms in seven year olds.  
Eur. Respir. J. 10 (1997) 2275-2278
125. Suelter, C.H.  
Experimentelle Enzymologie.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1990) 102, 137-158, 239-244
126. Suphioglu, C., Shing, M.B., Taylor, P., Bellomo, R., Holmes, P., Puy, R., Knox, R.B.  
Mechanism of grass-pollen induced asthma.  
Lancet 339 (1992) 569-572
127. Takafuji, S., Suzuki, S, Koizumi, K, Tadocora, K., Miyamoto, T., Ikemori, R., Muranaka, M.  
Diesel-exhaust particles inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice.  
J. Allergy Clin. Immunol. 79 (1987) 639-645
128. Thomas, P., Strube, W., Przybilla, B.  
Altered skin prick test reactivity and histamin release with extracts from pollen exposed to pollutants.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 113 (1997) 264-265

129. Thomas, P., Strube, W., Przybilla, B.  
Exposure of pollen to SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> or O<sub>3</sub>: Influence on protein release and histamine releasing capacity *in vitro*.  
In: "New Trends in Allergy IV",  
Ring, J.; Behrendt, H.; Vieluf, D. (Hrsg.),  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1997) 105-108
130. Vliet, P.v., Knape, M., Hartog, J.d., Janssen, N., Harssem, H., Brunekreef, B.  
Motor vehicle exhaust and chronic respiratory symptoms in children living near freeways.  
Environ. Res. 74 (1997) 122-132
131. Vrtala, S., Grote, M., Duchene, M., van Ree, R., Kraft, D., Scheiner, O., Valenta, R.  
Properties of tree and grass pollen allergens: Reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 102 (1993) 160-169
132. Waldron, G., Pottke, B., Dod, J.  
Asthma and the motorways – one district's experience.  
J. Publ. Health Med. 17 (1995) 85-89
133. Wallin, J., Segerström, U., Rosenhall, L., Bergmann, E., Hjelmroos, M.  
Allergic symptoms caused by long-distance transported birch pollen.  
Grana 30 (1991) 265-268
134. Weiland, S.K., Mundt, K.A., Rückmann, A., Keil, U.  
Self-reported wheezing and allergic rhinitis in children and traffic density on street of residence.  
An. Epidemiol. 4 (1994) 243-247

135. Weisweiler, W., Creutzmacher, H., Wien, F.  
Entwicklung und Optimierung eines quasikontinuierlichen Immissions-  
Meßverfahrens zur simultanen Bestimmung der sauren Luftinhaltsstoffe HCl,  
NO<sub>2</sub> und SO<sub>2</sub> mit einem Aktivsammler.  
PEF Statuskolloquium, Karlsruhe (1993)
136. WHO/IUIS (Allergen Nomenclature Subcommittee)  
Allergen nomenclatur.  
Bull. World Health Org. 72 (1994) 797-806
137. Wichmann H.E.  
Environment, life-style and allergy: The German answer.  
Allergo J. 4 (1995) 315-316
138. Wjst, R., Reitmeier, P., Dold, S.  
Road traffic and adverse effects on respiratory health in children.  
Brit. Med. J. 307 (1993) 596-600
139. Wodehouse, R.P.  
Pollen Grains.  
Hafner Press, New York (1935)
140. Woolcock, A.J., Peat, J.K., Trevillion, L.M.  
Is the increase in asthma prevalence linked to increase in allergen load?  
Allergy 50 (1995) 935-940
141. Wüthrich, B.  
Epidemiology of the allergic diseases: Are they really on the increase?  
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 90 (1989) 3-10

## **8. Danksagung**

Danken möchte ich Frau Prof. Dr. med. H. Behrendt vom Zentrum Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, für die Überlassung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. rer. nat. W.-M. Becker vom Forschungsinstitut Borstel für die Bereitstellung der monoklonalen Antikörper danken.

Für die Einführung in die experimentellen Techniken und viele wissenschaftliche Anregungen sei Dr. rer. nat. Christian Fritzsche, ehemals Abteilung für experimentelle Dermatologie und Allergologie an der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg, und Dr. rer. nat. Uwe Risse, Zentrum Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, herzlich gedankt.

## **9. Lebenslauf**

Geboren als Sohn von Heinrich Huss, selbstständiger Rundfunk- und Fernstechnikermeister, und Gisela Huss, Zahnarzhelferin, am 26.11.1970 in Kassel. Schulausbildung an der Gesamtschule Ihringshausen und dem Oberstufengymnasium Herderschule, Kassel, Wehrdienst in Kassel und Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg 1991.

Nach dem Medizinstudium in Hamburg, Uppsala / Schweden und Detroit / USA 1998 Anstellung als Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München. Seit Juli 1999 als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Zentrum Allergie und Umwelt an der genannten Klinik tätig.

Seit 1996 mit Marie Huss Marp verheiratet, Vater von Pauline, geb. 1997, und Frederik, geb. 2000.

## 10. Anhang

### 10.1 Daten

Daten zu *Abbildung 4.1-1*

Sollwert	Istwert	Istwert
rF [%]	rF [%]	rF [%]
errechnet	ohne	mit
	Pollen	Pollen
35,27	30,2	
39,24	34,2	
40		35,1
43	38,5	
49,79	45,3	
50		46,2
50,21	45,9	
50,1	45,9	
50,42	46,1	
50,52	46,1	
54	47,5	
55,81	50	
57,78	50	
57,7	50,3	
58,51	50,3	
58,72	50,4	
60		53,3
67,14	60,4	
69,2	59,7	
70		61,5
80		73
82,86	73,8	
89,5	76,7	

Daten zu *Abbildung 4.2-1*

	Honiggras	Honiggras
Expositionsdauer	<i>Aqua bidest.-</i>	Ammoniumcarbonat-
bei 0 % rF	Extraktion	Extraktion
0	0,1533	0,2420
1,5	0,1565	0,2671
3	0,1676	0,2773
6	0,1876	0,2860
9	0,1630	0,2942
[h]	[g/ml]	[g/ml]

Daten zu Abbildungen 4.2-2 bis 4.2-6

Extraktions- dauer	Hasel	Hasel	Erle	Erle	Birke	Birke
	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer
3	0,009	0,01	0,0024	0,0205	0,027	0,029
6	0,0100	0,0200	0,0069	0,0236	0,0290	
9	0,0140	0,0250	0,0084	0,0271	0,0380	0,035
12	0,0190	0,0290	0,0127	0,0318	0,0430	0,042
15	0,0200	0,0350	0,0114	0,0334	0,0490	0,043
30	0,0280	0,0530	0,0176	0,0441	0,0540	0,059
60	0,0350	0,0700	0,0237	0,0536	0,0660	0,081
90	0,0390	0,0840	0,0263	0,0589	0,0680	0,084
120	0,0390	0,0970	0,0265	0,0632	0,0700	0,096
150	0,0370	0,1060	0,0289	0,0647	0,0690	0,11
[min]	[g/ml]	[g/ml]	[g/ml]	[g/ml]	[g/ml]	[g/ml]
Extraktions- dauer	Honiggras	Honiggras	Beifuß	Beifuß		
	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer	<i>Aqua bidest.</i>	AC-Puffer		
3	0,0803	0,1583	0,0842	0,1620		
6	0,0940	0,1771	0,0837	0,1697		
9	0,0952	0,1783	0,0899			
12	0,1181	0,1830	0,0930	0,1952		
15	0,1050	0,1938	0,0984	0,1936		
30	0,1294	0,2225	0,0986	0,2071		
60	0,1486	0,2472	0,1030	0,2219		
90	0,1621	0,2624	0,1068	0,2330		
120	0,1602	0,2423	0,1094	0,2335		
150	0,1727	0,2612	0,1101	0,2305		
[min]	[g/ml]	[g/ml]	[g/ml]	[g/ml]		

Daten zu *Abbildung 4.3-1* (Haselpollen)

	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	12100.		1210.		1119.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100,00	6,28	100,00	2,50	100,00	3,89
1,5	109,43	3,06	108,50	2,86	102,12	1,50
3	112,95	2,89	110,25	4,79	103,24	4,69
6	113,16	5,00	110,63	7,53	113,97	2,38
9	121,45	4,76	115,00	9,22	115,09	3,48
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	1203.		1206.		1201.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100,00	5,29	100,00	7,52	100,00	10,25
1,5	93,38	5,87	88,45	6,01	106,95	2,28
3	84,32	13,44	93,38	2,62	107,84	0,88
6	90,81	11,15	103,26	0,96	110,24	8,75
9	92,57	8,31	102,10	0,32	124,59	2,41
	[%von t0]					
	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	12100.		1210.		1119.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100,00	2,86	100,00	1,08	100,00	1,52
1,5	105,43	2,90	99,25	2,65	93,72	3,17
3	104,35	3,00	98,53	3,08	97,15	3,19
6	109,77	1,70	99,49	0,27	98,89	1,33
9	109,48	2,62	106,79	1,86	107,56	6,74
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	1203.		1206.		1201.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100,00	1,16	100,00	1,70	100,00	2,73
1,5	99,71	7,23	95,36	3,28	89,27	1,18
3	97,32	4,90	100,22	1,36	92,00	0,92
6	104,94	1,83	103,80	1,10	93,49	1,28
9	108,03	2,12	101,37	0,73	98,65	3,39
	[%von t0]					

Daten zu *Abbildung 4.3-2* (Erlenpollen)

	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	09110.		0912.		0909.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100,00	3,05	100,00	4,17	100,00	2,66
1,5	100,33	2,58	103,14	0,28	92,48	1,59
3	103,48	2,81	106,29	4,17	97,56	1,33
6	94,03	1,17	105,11	1,39	94,92	3,46
9	104,98	1,17	109,43	9,72	91,73	2,13
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	0913.		0911.		0910.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100,00	1,14	100,00	1,32	100,00	1,55
1,5	96,57	1,43	90,32	3,42	89,50	0,93
3	95,36	7,13	87,34	0,79	97,16	2,48
6	93,15	5,70	85,66	2,63	97,16	1,86
9	93,95	4,56	89,39	6,32	98,03	--
	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	09110.		0912.		0909.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100,00	5,86	100,00	7,78	100,00	3,64
1,5	131,61	--	113,88	3,53	123,37	0,65
3	138,02	6,32	113,95	3,53	121,58	--
6	142,75	5,31	114,01	0,54	122,97	3,64
9	145,08	21,07	128,21	7,96	134,13	7,47
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	0913.		0911.		0910.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100,00	5,99	100,00	0,09	100,00	2,95
1,5	106,58	1,88	102,40	2,76	107,13	1,63
3	111,07	2,68	106,50	0,83	110,37	0,51
6	121,76	5,28	107,80	1,93	112,96	2,14
9	129,10	6,71	118,19	0,46	120,81	2,24
	[%von t0]					

Daten zu *Abbildung 4.3-3* (Birkenpollen)

	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	12200.		0131.		1215.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100	7,31	100	6,1	100	0,16
1,5	97,44	4,04	101,95	3,15	97,3	5,84
3	97,86	6,65	98,79	7,76	96,82	5,09
6	96,94	3,91	95,79	3,29	94,44	1,957
9	107,55	5,91	93,94	3,29	97,09	5,4
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	0126.		0128.		1220.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100	3,3	100	2,04	100	3,44
1,5	99,75	4,27	93,97	3,44	86,02	0,77
3	90,64	4,35	89,67	1,06	83,78	4,1
6	94,23	3,42	88,04	1,31	79,45	4,01
9	100,6	1,75	90,07	5,03	87,36	5,63
	[%von t0]					
	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	12200.		0131.		1215.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100	0,36	100	1,53	100	2,26
1,5	114,17	1,24	103,28	3,55	103,84	2,37
3	112,73	2,05	102,86	1,5	101,73	6,05
6	116,78	2,28	107,33	3,31	109,22	3,03
9	125,93	2,57	127,13	4,17	115,4	4,86
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	0126.		0128.		1220.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100	1,87	100	2,64	100	2,06
1,5	107,19	3,89	99,76	2,9	100,84	4,06
3	102,16	1,47	101,32	3,07	101,12	1,86
6	109,38	4,22	115,23	2,15	99,13	1,2
9	112,97	1,15	114,27	2,06	110,5	2,94
	[%von t0]					

Daten zu *Abbildung 4.3-4* (Honiggraspollen)

	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	0603/0%		0613/40%		0701/50%	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100		100		100	
1,5	106,02		97,45		90,9	
3	112,84		94,56		91,11	
6	115,59		101,91		90,54	
9	117,4		103,53		95,89	
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	0610/60%		0503/70%		0625/80%	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100		100		100	
1,5	90,4		90,66		88,82	
3	92,4		90,66		86,23	
6	87		94,47		87,58	
9	90,2		92,89		61,13	
	[%von t0]					
	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	0603/0%		0613/40%		0701/50%	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100		100		100	
1,5	112,51		98,72		92,01	
3	114,29		97,29		89,87	
6	130,85		106,51		91,03	
9	115,19		103,71		94,6	
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	0610/60%		0503/70%		0625/80%	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100		100		100	
1,5	89,9		86,79		87,19	
3	93,1		88,32		86,91	
6	90,4		86,42		83,67	
9	93,7		90,1		70,46	
	[%von t0]					

Daten zu *Abbildung 4.3-5* (Beifußpollen)

	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	11110.		1111.		1020.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100,00	0,31	100,00	1,69	100,00	0,76
1,5	115,62	5,33	114,26	3,49	97,71	0,76
3	123,90	4,31	115,12	8,91	95,62	1,48
6	124,57	3,60	111,04	1,13	93,98	4,58
9	118,44	2,15	108,02	1,73	102,50	5,86
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	1018.		1104.		1019.	
Dauer[h]	<i>Aqua bidest.</i>					
0	100,00	4,09	100,00	5,25	100,00	3,21
1,5	99,94	3,30	95,49	3,16	96,46	3,53
3	99,42	4,55	96,39	7,78	95,08	2,96
6	100,92	5,07	93,97	1,40	92,14	1,17
9	96,23	6,91	94,15	0,35	92,66	4,88
	[%von t0]					
	0%rF	STD0%	40%rF	STD40%	50%rF	STD50%
Vers.Nr.:	11110.		1111.		1020.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100,00	1,66	100,00	2,75	100,00	2,43
1,5	101,42	0,36	97,19	2,93	101,25	2,70
3	104,32	2,55	102,70	0,36	102,40	2,38
6	104,51	0,93	101,02	1,44	105,98	0,87
9	109,18	1,98	106,31	3,65	106,77	1,82
	[%von t0]					
	60%rF	STD60%	70%rF	STD70%	80%rF	STD80%
Vers.Nr.:	1018.		1104.		1019.	
Dauer[h]	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
0	100,00	1,25	100,00	0,59	100,00	0,45
1,5	99,88	8,28	95,61	2,25	98,37	2,05
3	100,73	7,18	100,31	1,30	93,49	5,64
6	105,46	1,97	103,52	1,94	94,14	2,42
9	104,08	6,27	99,16	1,08	98,46	1,75
	[%von t0]					

Daten zu *Abbildung 4.3-6*

rF[%]	Hasel	Erle	Birke	Honiggras	Beifuß
0	1,52	3,07	2,1	2,5	2,7
40	6,3	5,47		6,6	6,6
50	5,56		7,52		6,84
60	9,08		8,97		9,28
70	11,27	11,01	12,23	11,96	10,56
80	16,1		12,03		13,5
	H <sub>2</sub> O/Pollen				
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]

Daten zu *Abbildung 4.3-7* und *4.3-8*

rF%	Honiggras		HoniggrasAC	
0	118,55		134,21	
40	109,11		114,04	
50				
60				
70	107,3		98,16	
80				
	in % von t0		in % von t0	
rF%	Beifuß	BeifußSTD	BeifußAC	Beif.ACSTD
0	128,03	3,7	107,41	0,95
40	118,89	1,21	108,16	1,54
50	100,88	4,92	113,76	0,93
60	111,24	5,59	116,25	2,17
70	105,06	1,57	115,72	2,17
80	106,52	1,35	108,83	2,8
	in % von t0		in % von t0	

Daten zu Abbildung 4.4.1

Dauer	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>
VersNr/rF%	0905/80%	0905/80%	0904/50%	0904/50%	0908/0%	0908/0%
mit SO <sub>2</sub>	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle
0	100	100	100	100	100	100
1,5	89	96	94	91	112	102
3	86	84	95	93	110	109
6	85	88	101	91	117	
9	67	64	102	96	107	106
[h]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]
Dauer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
VersNr/rF%	0905/80%	0905/80%	0904/50%	0904/50%	0908/0%	0908/0%
mit SO <sub>2</sub>	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle
0	100	100	100	100	100	100
1,5	94	86	96	97	103	110
3	87	87	91	95	111	115
6	96	87	100	94	112	118
9	83	77	102	101	112	
[h]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]
Dauer	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidest.</i>
VersNr/rF%	0603/0%	0603/0%	0701/50%	0701/50%	0625/80%	0625/80%
mit SO <sub>2</sub>	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle
0	100	100	100	100	100	100
1,5	101,2	106,02	98,46	90,9	89,64	88,82
3	108,04	112,84	102,28	91,11	85,81	86,23
6	111,04	122	99,14	90,54	79,8	
9	110,91	117,4	97,49	95,89	62,04	61,13
[h]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]
Dauer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer	AC-Puffer
VersNr/rF%	0603/0%	0603/0%	0701/50%	0701/50%	0625/80%	0625/80%
mit SO <sub>2</sub>	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle	13100µg/m <sup>3</sup>	Kontrolle
0	100	100	100	100	100	100
1,5	115,42	112,51	101,55	92,01	86,66	87,19
3	114,74	114,29	103,98	89,87	86,06	86,91
6	120,54	130,85	98,45	91,03	85,17	83,67
9	123,63	122	98,88	94,6	67,65	70,46
[h]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]	[%von t0]