

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

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt)

**Wechselwirkungen zwischen Birkenpollen und humanen
polymorphonukleären Granulozyten von Atopikern und Normalpersonen:
Bedeutung für die Initialphase der allergischen Entzündung**

Anna Kasche

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. apl. Prof. Dr. R. Engst
3. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann

Die Dissertation wurde am 17.04.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2002 angenommen.

Einige Ergebnisse dieser Doktorarbeit sind publiziert worden in:

Behrendt H, Tomczok J, Sliwa-Tomczok W, **Kasche A**, Ebner von Eschenbach, WM Becker, Ring J

Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic reaction.

International Archives of Allergy and Immunology 1999, 118: 414-418

Behrendt H, **Kasche A**, Ebner von Eschenbach C, Risse U, Huss-Marp J, Ring J
Secretion of proinflammatory eicosanoid like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization.

International Archives of Allergy and Immunology 2001, 124: 121-125

Behrendt H, Krämer U, Schäfer T, **Kasche A**, Eberlein-König B, Darsow U, Ring J
Allergotoxicology – A research concept to study the role of environmental pollutants in allergy.

Allergy & Clinical Immunology International 2001, 13: 122-128

Traidl-Hoffmann C, **Kasche A**, Jakob T, Huger M, Plötz S, Feussner I, Ring J, Behrendt H

Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes.

Journal of Allergy und Clinical Immunology 2002, 109: 831-818

und auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt worden:

Kasche A, Risse U, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Huss-Marp J, Ring J, Behrendt H

Role of polymorphonuclear neutrophils in initiation of allergic sensitization?

ICA International 2000, 2: 190

Kasche A, Risse U, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Huss-Marp J, Ring J, Behrendt H

Pollutant modified pollen induce MPO-release from polymorphonuclear leukocytes
Allergologie 2000, 23: 421-422

Kasche A, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Risse U, Huss-Marp J, Ring J, Behrendt H

Influence of volatile organic compounds on initiation of allergic sensitization.

Allergy 2001, 56: 102

Kasche A, Traidl C, Feussner I, Huss-Marp J, Ring J, Behrendt H

Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances from pollen grains.

J Eur Acad Dermatol Venereol 2001, 15: 106

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Allergie und Anaphylaxie: Geschichte, Definition und Einleitung	7
1.1.1	Immunglobulin E	11
1.1.2	IgE-Rezeptoren	12
1.2	Heuschnupfen: Geschichte und Definition	13
1.3	Pollen als Allergenträger	17
1.4	Neutrophile Granulozyten	20
1.4.1	Beschreibung von Mediatoren, die aus PMN freigesetzt werden sowie von Mediatoren, die die PMN aktivieren	24
1.4.2	Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der allergischen Soforttypreaktion	28
2.	Zielsetzung der Arbeit	30
3.	Material und Methoden	31
3.1	Material	31
3.1.1	Probanden	31
3.1.2	Pollen	31
3.1.3	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte	34
3.2	Methoden	38
3.2.1	Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten (PMN)	38
3.2.2	Inkubationsansätze von PMN und Birkenpollen	40
3.2.3	Inkubation der Pollen	40
3.3	Morphologische Methoden	41
3.4	Bestimmung von MPO, HNL und IL-8 in Überständen von PMN-Pollen-Suspension	43
3.5	Bestimmung von Gesamtprotein und Majorallergen Bet v 1 in Pollenüberständen	44
3.6	Bestimmung von Lipidmediatoren (LTB ₄ , LTC ₄ /D ₄ /E ₄ , PGE ₂) in Pollenüberständen	45
3.7	Migrationsassay	46
3.8	Isolierung von 13-HODE und 13-HOTE aus Birkenpollen und Nachweis mittels HPLC	46
3.9	Nachweis der Lipoxygenase in Birkenpollen	47
3.10	Statistische Auswertung	48

4.	Ergebnisse	49
4.1	Wechselwirkungen zwischen Birkenpollen und humanen PMN <i>in vitro</i>	49
4.1.1	Morphologie	49
4.1.2	Funktionelle Parameter	55
4.1.2.1	Freisetzung von MPO und HNL aus humanen PMN nach Stimulation mit Birkenpollen	55
4.1.2.2	Messung von chemotaktischen Faktoren (IL-8 und LTB ₄) und immunmodulatorischen Substanzen (PGE ₂) im Überstand von Pollen-stimulierten PMN	58
4.2	Freisetzung von Polleninhaltsstoffen aus Birkenpollen <i>in vitro</i>	63
4.2.1	Gesamtprotein und Majorallergen Bet v 1: Kinetik, pH- und Temperaturabhängigkeit	63
4.2.2	Freisetzung von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen	69
4.2.3	Freisetzung von LTB ₄ - und PGE ₂ -ähnlichen Substanzen aus Birken-, Gras-, Beifuß- und Kieferpollen im Vergleich	78
4.2.4	Identifizierung und Charakterisierung der Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen mittels HPLC	80
4.2.5	Nachweis der biologischen Relevanz der Eicosanoid-ähnlichen Substanzen	82
5.	Diskussion	85
6.	Zusammenfassung	100
7.	Literatur	102
8.	Danksagung	139
9.	Lebenslauf	140
10.	Anhang	141
10.1	Daten zu Abbildungen und Tabellen	141

Verzeichnis der Abkürzungen

APC	Antigen Presenting Cells
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CI	Confidence Interval
CR	Complement Receptor
ECP	Eosinophilic Cationic Protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPX	Eosinophilic-Derived Neurotoxin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
fMLP	N-Formyl-Methionin-Leucyl-Phenylalanin
g	Gravitation
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating-Factor
h	Stunde
H ₁ -Rezeptor	Histamin-Rezeptor 1
H ₂ -Rezeptor	Histamin-Rezeptor 2
HNL	Humanes Neutrophiles Lipokalin
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HOTE	Hydroxyoctadecatriensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraenoic acid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
IFN γ	Interferon γ
kDa	Kilo Dalton
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA ₄	Leukotrien A ₄
LTB ₄	Leukotrien B ₄

LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTD ₄	Leukotrien D ₄
LTE ₄	Leukotrien E ₄
M	mol/Liter
MAK	monoklonaler Antikörper
MBP	Major Basic Protein
MPO	Myeloperoxidase
MTP	Mikrotiterplatte
min.	Minute
NAD	Nicotin-Adenin-Dinucleotid
NAP-1	Neutrophil Attractant Protein-1
NCA	Neutrophil Chemotactic Activity
NDGA	Nordihydroguaiaretic acid
PAF	Platelet-Activating Factor
PBS	Phosphate buffered solution
PGD ₂	Prostaglandin D ₄
PGE ₂	Prostaglandin E ₄
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PMA	Phorbol Myristat Acetat
RI	hochaffiner Fcε-Rezeptor für IgE
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standard Deviation
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VIP	Vasoactive Intestinal Polypeptide

1. Einleitung

1.1 Allergie und Anaphylaxie: Geschichte, Definition und Einleitung

Zwei Wiener Pädiater, CLEMENS VON PIRQUET und BELA SCHICK, berichteten im Jahr 1905 von einer Serumkrankheit, die mit Fieber, geschwollenen Drüsen und Nesselsucht einherging und durch Injektion von Streptokokken-Antitoxin-Serum hervorgerufen wurde. Ein Jahr später, 1906, schlug PIRQUET in der Münchner Medizinischen Wochenschrift vor, diese Art der Reaktion mit dem Begriff *Allergie* zu belegen. Allergie ist danach eine spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus nach Allergenkontakt [179]. Nach RING wird Allergie als 'spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit' [193] definiert.

Im Sommer 1901 gingen die französischen Wissenschaftler CHARLES RICHET und PAUL PORTIER mit PRINZ ALBERT I von Monaco auf Mittelmeerkreuzfahrt. Der Prinz von Monaco war ein naturwissenschaftlich sehr interessierter Mensch und hatte oft herausragende Forscher als Gäste auf seiner Yacht. Die Herren machten die Beobachtung, daß Fische an der Quallenart *Physalia* hängenblieben und von dieser angedaut wurden. Fischer berichteten von starken Schmerzen nach Berührung von Tentakeln der selben Quallen. PRINZ ALBERT vermutete daher, daß diese Quallenart ein starkes Gift sezernieren würde und beauftragte PAUL PORTIER und CHARLES RICHET mit der Untersuchung dieses Gifts. Die Wissenschaftler injizierten das stark konzentrierte Gift in Meerschweinchen, Frösche, Enten und Tauben. Das Gift hatte zentralnervöse Effekte und wurde aus diesem Grunde Hypnotoxin genannt. Als die beiden Wissenschaftler nach Paris zurückgekehrt waren, setzten sie die Untersuchungen mit der Quallenart *Actinia sulcata* fort, da *Physalia* dort nicht zugänglich war. Die neuen Untersuchungen mit dem Actinariatoxin wurden mit Hunden durchgeführt. Um toxische Dosen des Gifts zu ermitteln, wurde mit geringen, nicht letalen Dosen begonnen. Als Hunden ein zweites Mal das Actinariatoxin injiziert wurde, geschah das Unvorhergesehene: die Hunde verstarben innerhalb von Minuten, obwohl ihnen kleinste, nicht letale Dosen injiziert worden waren. Da man annahm, daß dieser Vorgang das Gegenteil von

Prophylaxe (gr. Verhütung) war, wurde er mit dem Begriff Anaphylaxie (gr. falscher Schutz; ana: daneben, phylaxis: Schutz) belegt [181; 190]. Im Jahre 1913 wurde PAUL PORTIER für die Studien über Anaphylaxie der Nobelpreis im Bereich Medizin / Physiologie verliehen [147].

Heute wird unter Anaphylaxie eine immunologisch bedingte akute allergische Allgemeinreaktion begriffen, die mit typischen Symptomen einhergeht und nach RING und MESSMER in Schweregrade I bis IV eingeteilt wird. Bei Grad I kommt es zum Auftreten von Juckreiz, Flush und Urtikaria, bei Grad II treten Nausea, Krämpfe, Rhinorrhoe, Heiserkeit, Dyspnoe, Tachykardie, Hypotension und Arrhythmie hinzu. Grad III ist gekennzeichnet durch Erbrechen, Defäkation, Larynxödem, Bronchospasmus, Zyanose und Schock, bei Grad IV kommt es zum Atem- und Kreislaufstillstand [192].

Im Jahre 1963 wurden die allergischen Reaktionen von COOMBS und GELL in vier Typen (I bis IV) eingeteilt [50]. Bei der Typ I-Reaktion handelt es sich um eine Immunglobulin E-vermittelte Soforttypreaktion, die mit Krankheitsbildern wie allergische Rhinitis, allergisches Asthma bronchiale, Urtikaria und Quincke-Ödem sowie Bienen- und Wespengiftallergie verbunden ist. Typische Beispiele einer zytotoxischen Reaktion (Typ II) sind die allergische hämolytische Anämie, die allergische Agranulozytose und die allergische Thrombozytopenie. Als klinische Beispiele einer Immunkomplex-Reaktion (Typ III-Allergie) sind die Immunkomplex-Anaphylaxie, Serumkrankheit, die allergische (Immunkomplex-) Vaskulitis und die exogen allergische Alveolitis zu nennen. Klassisches Beispiel einer Typ IV-Allergie ist die Kontaktdermatitis bzw. das Kontaktekzem. Später wurden noch die Typ V, die granulomatöse Reaktion wie z. B. bei Injektionsgranulomen auftretend und die "stimulierende" Überempfindlichkeit (Typ VI) wie bei der Autoimmunthyreoiditis, Myasthenia gravis und Insulin-Resistenz beschrieben.

IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ I-Allergie)

Bei der allergischen Typ I-Reaktion binden mindestens zwei IgE-Moleküle, die über ein Allergen verbunden sind, an spezifische Rezeptoren von Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten. In den ersten 20 Minuten kommt es zur Frühreaktion. Es wird hauptsächlich Histamin, aber auch ECF (Eosinophil chemotactic factor),

NCF (Neutrophil Chemotactic Factor) und Proteoglykane wie z. B. Heparin sowie Leukotrien C₄, Prostaglandin D₂ und Thromboxan B₂ freigesetzt [160]. Die Freisetzung von Histamin führt zur Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Bronchokonstriktion und Steigerung der Mukossekretion. Sechs bis zwölf Stunden nach Allergenkontakt beginnt die Spätphase der Soforttypreaktion mit Zelleinwanderung, die durch Chemokine, Platelet-Activating Factor (PAF) und neutrale Proteasen hervorgerufen wird. In der Spätphase der allergischen Reaktion werden zudem Leukotriene freigesetzt [161]. Als erste Zellen erreichen die neutrophilen Granulozyten den Ort der Entzündung, dann folgen eosinophile Granulozyten und nachfolgend mononukleäre Zellen [69].

Zytotoxische Reaktion (Typ II-Allergie)

Bei der zytotoxischen Reaktion wird Immunglobulin G (IgG) oder Immunglobulin M (IgM) gebildet, das gegen eine bestimmte Oberflächendeterminante von Zellen gerichtet ist. Ein Medikament wird durch die Bindung an ein körpereigenes Protein auf der Oberfläche von Leukozyten bzw. Thrombozyten zum Vollantigen. Das Komplementsystem wird durch die Bindung des Antikörpers am Vollantigen aktiviert und bewirkt eine Zell-Lyse. Abhängig von der lysierten Zellart führt dies zur Agranulozytose, Thrombozytopenie oder hämolytischer Anämie.

Immunkomplex-Reaktion (Typ III-Allergie)

Bei der Immunkomplex-Reaktion kommt es zu einer Bindung zwischen einem zirkulierenden Antikörper (meist IgG, selten IgM) und einem Antigen. Dieser im Blut zirkulierende Immunkomplex führt zur klassischen Komplementaktivierung über C1q und zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Man unterscheidet zwei Typen der Immunkomplex-Reaktion: Die Arthus-Reaktion und die Serumkrankheit.

Bei der Arthus-Reaktion kommt es zur lokalen Komplexbildung. Im Jahre 1903 injizierte MAURICE ARTHUS Kaninchen artfremdes Pferdeserum. Die Gabe der ersten Injektion verlief ohne Zwischenfälle, eine zweite bewirkte nach vier bis zehn Stunden Ödem- und Erythembildung. Wie war diese Reaktion entstanden? Die erste Injektion hatte zur Produktion von Pferdeserum-Antikörpern geführt, so daß bei erneuter Injektion Antikörper-Antigen-Komplexe gebildet wurden, die das

Komplementsystem aktivierten. Zusätzlich hatten die intravasal gelegenen Komplexe eine Thrombozytenaggregation und Freisetzung von vasoaktiven Aminen mit nachfolgender Ödem- und Erythembildung hervorgerufen.

Im Gegensatz dazu tritt die Serumkrankheit erst sieben bis zehn Tage nach Injektion von heterologen Antiseren (z.B. Tetanus) oder parenteraler Gabe von Antibiotika (z.B. Penicillin) auf [64]. Hierbei kommt es zur Bindung von Antiserum bzw. Antibiotikum an körpereigene Proteine. Durch diese Kopplung werden die körpereigenen Proteine vom Immunsystem des Körpers als 'fremd' erkannt. Die klinischen Symptome sind gekennzeichnet durch Urtikaria, Fieber, Arthralgien, Myalgien, Lymphknotenschwellungen und Proteinurie. Das Krankheitsbild ist selbstlimitierend.

Zelluläre Überempfindlichkeit (Typ IV-Allergie)

Die allergische Reaktion vom verzögerten Typ wird über sensibilisierte T-Lymphozyten vermittelt. Die Sensibilisierung erfolgt durch Kontakt der T-Lymphozyten mit hochpolymorphen Oberflächenstrukturen des MHC- (Major Histocompatibility Complex) Antigens. MHC determiniert genetisch die Zugehörigkeit zum eigenen Organismus [250]. Wird die Oberfläche als 'fremd' erkannt, so kommt es zu einer Sensibilisierung der T-Lymphozyten. Bei erneutem Kontakt zwischen dem Antigen (Allergen) und einer spezifisch sensibilisierten T-Zelle erfolgt die Proliferation und Differenzierung zu T-Effektorzellen. Ein klassisches Beispiel der allergischen Reaktion vom verzögerten Typ ist das allergische Kontaktekzem, das erstmals 1895 von JOSEF JADASSOHN als Kontaktüberempfindlichkeit gegenüber Quecksilbersalzen beschrieben wurde [112]. Bei der Kontaktdermatitis wird die Tertiärstruktur der MHC-Determinante durch niedrig-molekulare Fremdsbstanzen (z. B. Metallsalze) verändert und die Antigen-präsentierende Zelle somit als 'fremd' erkannt. Ungeklärt ist, ob die MHC-Determinante durch Bindung von Fremdsbstanzen oder direkt durch physikalisch-chemische Einflüsse verändert wird. Arzneimittel-Exantheme, Tuberkulin-Reaktionen sowie die Abstoßung von Organtransplantaten sind weitere typische Beispiele für eine Typ IV-Reaktion.

Granulomatöse Reaktion (Typ V-Allergie)

Die Typ V-Reaktion wird als granulomatöse Reaktion bezeichnet. Bei diesem Reaktionstyp bilden sich innerhalb von zwei bis fünf Wochen nach Injektion von Fremdstoffen (z. B. Zirkonium-Ion oder lösliches Kollagen) Epitheloid-Zellgranulome [194].

Stimulierende Überempfindlichkeit (Typ VI-Allergie)

Bei der stimulierenden Überempfindlichkeit 'stimulating hypersensitivity' nach Roitt [197] kommt es zu einer spezifischen Antikörperwirkung. Dies geschieht beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (LATS = Long Acting Thyroid Stimulating Factor) oder bei der Myasthenia gravis mit Antikörpern gegen den Acetylcholin-Rezeptor an der motorischen Endplatte. Andere Beispiele sind der Arzneimittel-induzierte Lupus erythematosus, der durch Hydralazin und Procainamid hervorgerufen wird sowie die Insulinresistenz, bei der nach Injektion von Rinder-Insulin von Anti-Insulin-IgG-Antikörpern produziert werden [135].

1.1.1 Immunglobulin E

Im Jahre 1967 entdeckten unabhängig voneinander das Ehepaar ISHIZAKA sowie S.G.O. JOHANSSON und HANS BENNICH ein Immunglobulin, das keiner bekannten Klasse zuzuordnen war. Erst als die beiden Gruppen sich 1968 trafen, erkannten sie, daß sie ein und dieselbe Entdeckung gemacht hatten. Sie einigten sich auf den Namen Immunglobulin E für diese neue Antikörper-Klasse [21]. Bereits im Jahre 1925 hatte COCA den gleichen Antikörper als "atopisches Reagin" bezeichnet [47]. Schon drei Jahre zuvor hatten PRAUSNITZ und KÜSTNER den Transfer der Überempfindlichkeit vom Soforttyp mittels Serum beschrieben [183]. Das IgE-Molekül besitzt ein Molekulargewicht von 190 kDa [204] und wird in zwei Regionen unterteilt: Das konstante Fragment (fragment crystallizable=Fc), an dem Mastzellen, Basophile, Eosinophile und Langerhanszellen über hochaffine (Fcε-R1) und niedrigaffine (Fcε-R2) binden und das Antigen-bindende Fragment (Fab), an dem das Allergen bindet. Über diesen Antikörper wird nach Bridging durch das Antigen die allergische Soforttypreaktion

ausgelöst. Im Gegensatz zu anderen Immunglobulinen werden nur sehr geringe Konzentrationen IgE im Serum nachgewiesen (0,03 mg/dl) [204].

1.1.2 IgE-Rezeptoren

Die spezifischen IgE-Rezeptoren werden als $Fc\varepsilon$ -Rezeptoren bezeichnet. Die Rezeptoren werden in hochaffine ($Fc\varepsilon$ -RI) und niedrigaffine ($Fc\varepsilon$ -RII) unterteilt. Zahlreiche an der allergischen Reaktion beteiligte Zellen tragen diese Rezeptoren auf ihrer Oberfläche.

Hochaffiner $Fc\varepsilon$ -Rezeptor ($Fc\varepsilon$ -RI)

Der hochaffine $Fc\varepsilon$ -Rezeptor ist aus drei Ketten (α , β und γ) aufgebaut, wobei die γ -Kette für die Signalübertragung verantwortlich ist. Der Rezeptor und das Immunglobulin E bilden einen stabilen Komplex, durch den ein intrazelluläres Signal ausgelöst wird, was zur Aktivierung der Zelle führt. Der Rezeptor ist auf Mastzellen [185], basophilen [121] und eosinophilen Granulozyten [90], Langerhanszellen [25] und wie kürzlich gezeigt auch auf neutrophilen Granulozyten [91] lokalisiert.

Niedrigaffiner $Fc\varepsilon$ -Rezeptor ($Fc\varepsilon$ -RII)

$Fc\varepsilon$ -RII (=CD23) ist ein niedrigaffiner Rezeptor, der auf neutrophilen [248] und eosinophilen Granulozyten [42], Makrophagen [151], Langerhanszellen [24], Thrombozyten [115], T- [43] und B-Lymphozyten [95] und follikulär dendritischen Zellen [191], aber auch auf epithelialen Zellen im Thymus [136] exprimiert ist. Das proteolytische Spaltprodukt des extrazellulären Teils von CD23 wird als lösliches CD23 (soluble CD23=sCD23) bezeichnet und kann im Serum nachgewiesen werden. Das sCD23 ist an der IgE-vermittelten zytotoxischen Wirkung gegenüber Parasiten (ADCC=Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) und an der allergischen Soforttypreaktion beteiligt [90], verursacht die IgE-bindende Eigenschaft des Rezeptors, wirkt wachstumsfördernd für B-Lymphozyten [164] und ist an der Regulation der IgE-Synthese beteiligt [46].

1.2 Heuschnupfen: Geschichte und Definition

Heuschnupfen

1819 berichtete der Londoner Arzt JOHN BOSTOCK vor der Royal Medical Society of London von „periodisch auftretenden Affektionen der Augen und der Brust“, die ihn quälten und die er *Catarrhus aestivus* oder Sommerkatarrh nannte [30]. Später entstand der Begriff Heuschnupfen, weil ein Zusammenhang zwischen dem Ausdünnen von Heu und dem Auftreten des Schnupfens festgestellt wurde. Der Zusammenhang zwischen Heuschnupfen und Pollen wurde 1873 von CHARLES BLACKLEY, einem Arzt aus Manchester, erstmals beschrieben. Der an Heuschnupfen leidende Arzt rieb sich Pollen in eine Kratzwunde und rief dadurch eine Rhinokonjunktivitis und asthmatische Beschwerden hervor [27].

Die Lebenszeitprävalenz von Heuschnupfen (allergische Rhinokonjunktivitis, Pollinosis) wird heute in der europäischen Bevölkerung mit 5,5 bis 16,5% (Deutschland 9,5% bis 19,6%) angegeben [220]. Birken- und Lieschgraspollen sind Hauptverursacher der allergischen Rhinokonjunktivitis in Europa [54].

Pathophysiologie des Heuschnupfens:

Die allergische Rhinokonjunktivitis (Heuschnupfen) gehört zum atopischen Formenkreis und zur IgE-vermittelten Typ I-Allergie (nach COOMS und GELL) und ist klinisch gekennzeichnet durch Augentränen, Augen- und Nasenjucken, Niesattacken, Fließschnupfen, eventuell im Wechsel mit verstopfter Nase, akuter Bindehautentzündung mit Rötung, Schwellung und Juckreiz im Rachen und in den Gehörgängen. Die allergische Rhinokonjunktivitis ist eine spezifische Antwort auf wiederholte Allergenexposition bei sensibilisierten Patienten. Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis besitzen spezifische IgE-Antikörper gegenüber den klassischen Inhalationsallergenen, wie z. B. aus Pollen, Hausstaubmilben oder Tierhaaren. Diese Antikörper binden an hochaffine Rezeptoren von Mastzellen, basophilen Granulozyten und eosinophilen Granulozyten in der Nasenschleimhaut und von Langerhanszellen (IgE RI) in der Haut sowie an niedrigaffine Rezeptoren der Monozyten und Thrombozyten. Nach erneuter Exposition mit dem spezifischen Allergen kommt es z. B. zur

Mastzelldegranulation mit Freisetzung von präformierten Mediatoren wie Histamin und neu synthetisierten Mediatoren wie Leukotrienen und Prostaglandinen. Auch werden Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Interleukin-1 (IL-1), IL-3, IL-4 , IL-5 und IL-6 freigesetzt [162].

Pathophysiologisch spielt auch die Anwesenheit von Langerhanszellen in der Nasenschleimhaut, wie von FOKKENS et al. elektronenmikroskopisch gezeigt [74] sowie die lokale Immunoglobulin E-Produktion eine bedeutende Rolle [75]. BACHERT et al. [9] konnten zeigen, daß das proinflammatorische Zytokin Interleukin 1 β in der Pollensaison bei Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis hochreguliert wird.

Heuschnupfen stellt ein immer größer werdendes Gesundheitsproblem dar. Heuschnupfen ist der Ausgangspunkt für allergische Erkrankungen der tieferen Atemwege, allergisches Asthma sowie für Chronifizierung. So konstatiert WÜTHRICH [246] für Erkrankungen des atopischen Formenkreises, insbesondere die Pollenallergie, einen deutlichen Anstieg der Prävalenz innerhalb der vergangenen Jahrzehnte. Die der zunehmenden Allergieprävalenz zugrundeliegende Ursache ist unbekannt, jedoch werden - ausgehend von epidemiologischen Studien [127] verschiedener Gruppen, die Ost- und Westdeutschland seit der Wiedervereinigung verglichen haben - eine Reihe möglicher Faktoren diskutiert [196]: Neben Lifestyle-Faktoren („westlicher Lebensstil“) [245], 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 [129], in Betracht. Die epidemiologischen Studien ergaben übereinstimmend niedrigere Raten für die Prävalenz allergischer Erkrankungen des Respirationstraktes und Sensibilisierungen für die ostdeutschen Bundesländer im Vergleich zu Westdeutschland. Dagegen traten in Ostdeutschland vermehrt allergische Hauterkrankungen sowie Reizungen und Infektionen der oberen Atemwege auf [17; 203]. In Vergleichsstudien, die VON MUTIUS et al. [159] zur Prävalenz asthmatischer und anderer allergischer Erkrankungen bei Schulkindern in Leipzig und München von 1991 bis 1993 durchführten, wurden bei den Kindern in München deutlich häufiger allergisches

Asthma bronchiale und allergische Rhinokonjunktivitis diagnostiziert, wohingegen in Leipzig die Bronchitisprävalenz im Vergleich 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 untersuchten KRÄMER et al. [129] anhand der an über 17.000 Kindern im Vorschulalter erhobenen Daten, ob die Luftverschmutzung als ein Risikofaktor für allergische Erkrankungen am Vergleich von Ost- und Westdeutschland gelten kann. Für Westdeutschland fand sich eine positive Korrelation allergischer Erkrankungen zur Nähe des Wohnortes zur Straße mit hohem Kraftfahrzeugaufkommen, nicht jedoch in Ostdeutschland. Diese Befunde wurden in einer Verkehrsbelastungsstudie bestätigt [129]. Die Autoren konnten zeigen, daß eine positive Assoziation zwischen der Prävalenz von Heuschnupfen und Heuschnupfen-Symptomen und dem Wohnen an stark verkehrsreicher Straße besteht.

Für Schwefeldioxid und Staubbiederschlag 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 [128]. In den ersten Verlaufsbeobachtungen nach der Wiedervereinigung konnte parallel zur Änderung der Lebensgewohnheiten, zu einem deutlichen Anstieg des Verkehrsaufkommens und zum Rückgang der Belastung mit den klassischen Luftschadstoffen ein Anstieg der Allergiehäufigkeit in den neuen Bundesländern festgestellt werden [203].

Allergische Erkrankungen bedeuten nicht nur für die Betroffenen eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität, sondern auch für die Volkswirtschaft eine zusätzliche Belastung. Allein für das Jahr 1996 registrierte das statistische Bundesamt 5,9 Millionen ambulante Arztbesuche bei Heuschnupfen [220] und für die Behandlung des Asthma bronchiale in Deutschland werden jährlich über 5 Milliarden DM aufgewendet [220]. Neben dem volkswirtschaftlichen Gesichtspunkt spielt auch der gesundheitspolitische eine Rolle. So verpflichtet zum Beispiel das

Grundgesetz den Gesetzgeber bei Maßnahmen zum Schutz der menschlichen Gesundheit dazu, vulnerable Gruppen zu berücksichtigen. Allergiker stellen grundsätzlich eine solche vulnerable Gruppe dar, deren besonderem Schutzbedürfnis bei der Rechtsetzung Rechnung getragen werden soll. Bei Allergikern handelt es sich um eine außerordentlich große Bevölkerungsgruppe. Im übrigen rechtfertigen sowohl die Schwere der akuten Erkrankung als auch die Chronifizierungstendenzen im Krankheitsverlauf die Berücksichtigung von Allergikern als vulnerabler Gruppe [220]. Unter Chronifizierung wird unabhängig vom jeweiligen Typ der Allergie, die Phase des Allergieverlaufs genannt, die der Sensibilisierungsphase und Auslösephase folgt. Neuere Erkenntnisse zeigen, daß Stoffe und Stoffgemische, die per se nicht allergen sind, die Allergieentstehung fördern („Adjuvans-Effekt“) und zur Chronifizierung beitragen. Der Etagenwechsel, d. h. die Entwicklung eines Bronchialasthmas aus einer allergischen Rhinokonjunktivitis wird als multifaktorieller Prozeß angesehen, der pathophysiologisch als allergische Entzündungsreaktion verläuft und ebenfalls zu chronischer Krankheit führt [220].

1.3 Pollen als Allergenträger

Insgesamt gesehen sind Allergene aus Allergenträgern der Außenluft und Innenraumlufte - Pollen, Schimmelpilzsporen, Hausstaubmilben und Tierhaare - die häufigsten und wichtigsten natürlichen Umweltfaktoren in der Entstehung, Auslösung und Unterhaltung atopischer Erkrankungen. Die Allergenträger der Außenluft sind die Pollen windbestäubter Pflanzen, von denen Birken-, Gras- und Beifußpollen die wichtigsten sind.

In der Pollenkunde (Palynologie) werden die Pollen nach botanischen, morphologischen und biochemischen Kriterien eingeteilt. Pollen besitzen meist einen Durchmesser von 15 bis 80 (z. T. bis 120) μm [220], Birkenpollen haben einen Durchmesser von 25 μm [36]. Die Menschen kennen Pollen schon seit Jahrtausenden: Die ersten Aufzeichnungen finden sich in prähistorischen Kunstwerken im Palast syrischer Könige 800 v. C. Der Name „Pollen“ wurde vom schwedischen Naturforscher LINNAEUS [123] bereits 1760 geprägt und leitet sich vom lateinischen Wortstamm „pollos“ ab, der ursprünglich „sehr feines Mehl“ bedeutete [205]. Im Griechischen heißt „pollós“ „viel“, was gut mit der großen Anzahl freigesetzter Pollenkörner übereinstimmt [205].

Pollen sind die Träger der männlichen Erbinformation und für die sexuelle Reproduktion von Pflanzen essentiell. Pollen bestehen aus zwei oder drei Zellen, welche zu einer Einheit verbunden sind [218] und deren Zusammensetzung typischerweise ungefähr aus 37% Kohlenhydraten, 20% Protein, 4% Lipiden und 3% Mineralien und 36% Wasser besteht [123].

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, bezeichnet man die Pollen als bi- und trinukleär [102]. Die Pollenwand selbst besteht aus einer inneren Intine, welche aus Polysacchariden aufgebaut ist, und einer äußeren Exine, welche aus dem sehr widerstandsfähigen Sporopollenin gebildet wird, das die Zellen vor physikalischen wie auch enzymatischen Einflüssen schützt [211]. Pollen der meisten Pflanzen verfügen über eine Exine, wohingegen die Anzahl der

Keimöffnungen sowie die Pollenform speziesspezifisch und für die morphologische Klassifikation der Pollen von Bedeutung sind [123].

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 befindlichen Substanz, dem Pollenkitt, gekennzeichnet sind, welche die Anheftung an den Vektor ermöglicht, besitzen Pollen anemophiler Pflanzen keinen Pollenkitt und werden schon bei geringer Luftbewegung fortgetragen [123].

Die Birke setzt pro Blütenstand ungefähr 5,4 Millionen Pollenkörner in die Atmosphäre frei [137]. Pollen windbestäubender Pflanzen werden bei Einatmung im Bereich der oberen Luftwege deponiert. Dort können sie beim Allergiker die Symptome der allergischen Rhinitis auslösen. Aufgrund ihrer Größe dringen sie nicht tiefer als bis zur Trachea in den Respirationstrakt ein [123]. Die Pollenflugsaison ist in Mitteleuropa in den verschiedenen geographischen Regionen unterschiedlich. Sie beginnt aber meist im Frühling und endet im Herbst: Im Februar/März blühen die Erlen- und Haselpollen und im März/April die Birkenpollen. Gräserpollen verursachen von Mai bis August Beschwerden, gefolgt von Kräutern, insbesondere Beifuß, zwischen August und September.

Zur Erklärung des allergischen Asthmas, dessen Symptome sich in den tiefen Lungenabschnitten, den terminalen Bronchioli, manifestieren, wird u. a. eine Freisetzung der Allergene aus den Pollen angenommen [224].

Pollenallergene sind vorwiegend im Pollen lokalisiert, nur in Einzelfällen konnte allergene Aktivität auf der Exine nachgewiesen werden. Wie von GROTE et al. beschrieben sind die Pollenallergene im Pollen lokalisiert, zum Beispiel im Zytoplasma, oft in Ribosomen-reicher Umgebung [94]. Aber auch in Mitochondrien, P-Partikeln und Stärkegranula sind Allergene beschrieben worden [20].

In trockener Umgebung sind Pollen sehr stabil und Allergene können über Jahrhunderte in Pollen vorhanden sein [218]. Jedoch wird eine Allergenfreisetzung aus Pollen durch hohe relative Luftfeuchtigkeit, Gewitter und Luftverschmutzung begünstigt. Zudem ist die Freisetzung von Allergenen temperatur-, zeit- und pH-abhängig [20].

Bei Allergenen handelt es sich um Proteine und Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 5 und 70 kDa, welche wasserlöslich sind und die bei Kontakt der Pollen mit der menschlichen Schleimhaut meist innerhalb von Sekunden freigesetzt werden und diese penetrieren können [216]. Sie wirken als Antigene und besitzen die Fähigkeit, eine IgE-vermittelte Immunantwort zu induzieren [54]. Identifizierte Allergene werden nach der Allergennomenklatur der Weltgesundheitsorganisation (WHO) benannt [244]. Hierbei wird unterschieden, ob natürliche Allergene funktionell entweder eine Protease wie z. B. bei Lieschgraspollen (*Phleum pratense*) oder ein PR-(pathogenesis-related) Protein sind wie bei Birkenpollen.

Bei den Birkenpollen gibt es vier Gruppen: Bet v 1, 2, 3 und 4. Bet v 1 besitzt ein Molekulargewicht von 24 kDa, Bet v 2 wiegt 14 kDa, Bet v 3 24 kDa und Bet v 4 8 kDa. Bet v 1 ist ein PR-Protein, das auch Ribonuclease-Aktivität zeigt [38], Bet v 2 ist ein Profilin [68] und Bet v 3 [232] und Bet v 4 [235] sind Kalzium-bindende Proteine.

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 [244].

1.4 Neutrophile Granulozyten

Im Jahre 1890 bemerkte METCHNIKOFF die starke Tendenz von bestimmten Blutzellen, sich in Richtung von Mikroorganismen zu bewegen und diese zu phagozytieren [153]. Die beschriebenen Zellen waren neutrophile Granulozyten, die wegen ihres polymorphen Zellkerns auch polymorphonukleäre Leukozyten (PMN) genannt werden. PMN adhären am Endothel von Blutgefäßen und verlassen den Blutkreislauf durch Wanderung (Transmigration) durch die Endothelzellen hindurch. LAWRENCE und SPRINGER konnten zeigen, daß die durch das Adhäsionsmolekül Selektin vermittelte Adhärenz nur schwach ist und die Wanderung (Rolling) der neutrophilen Granulozyten entlang von Endothelzellen nicht hemmt. Wohingegen die durch das Adhäsionsmolekül Integrin vermittelte Adhäsion die Wanderung der neutrophilen Granulozyten stoppt. Diese starke Adhäsion wird durch die Wechselwirkung zwischen den Integrinen auf der Oberfläche der PMN (CD11/CD18) mit ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1) auf der Endothelzelloberfläche [61] vermittelt. Folge der starken Adhäsion ist dann die Wanderung (Transmigration) der Zellen durch die Endothelzellen hindurch [134].

Der zweite Schritt der Adhäsionskaskade führt zur Aktivierung der Leukozyten. Für diesen Aktivierungsschritt sind hauptsächlich die Chemokine verantwortlich. Das wichtigste Chemokin ist das Interleukin-8, das entweder über CXCR1 und CXCR2 agiert. Die Wirkung der Chemokine beim Prozeß der Leukozytenextravasation ist im Grunde zweigeteilt. Einerseits wirken sie als chemotaktisch aktive Stoffe, d. h. die neutrophilen Granulozyten wandern entlang des Konzentrationsgradienten eines Chemokins auf die Quelle des Chemokins zu. Noch bevor der Vorgang der Chemotaxis, also der gerichteten Wanderung beginnt, bewirken die Chemokine jedoch zunächst eine Aktivierung, die das stabile Festhalten des neutrophilen Granulozyten ermöglicht und das Zurückkehren in den Blutkreislauf verhindert. Dies bedeutet, daß innerhalb von Sekunden, während der neutrophile Granulozyt noch auf der Gefäßwand rollt und erstmals mit dem auf der Endotheloberfläche präsentierten Chemokin in Kontakt kommt, die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten ablaufen muß. Bewerkstelligt wird dieser Prozeß durch die auf der Zelloberfläche zu findenden

Chemokinrezeptoren, die zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Eine besondere Eigenschaft der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist die Schnelligkeit ihrer Signalübertragung. Deshalb sind sie ideal geeignet, den nur Sekunden dauernden Kontakt mit dem Chemokin auf der Endotheloberfläche während des kurzen Rollens des Leukozyten zur Signalübertragung zu nutzen. Dabei kommt es, durch eine im Detail noch ungeklärte Kaskade von intrazellulären Signaltransduktionsschritten, zur Aktivierung der Integrine auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten.

Die stabile Adhäsion von Leukozyten, die den Scherkräften des Blutstroms standhält, wird durch die leukozytären Integrine vermittelt, deren Bindungspartner auf der Endotheloberfläche einer Familie von Glykoproteinen angehören, die als Immunglobulinfamilie bezeichnet wird. Integrine sind eigentlich Adhäsionsmoleküle, die die Zelle mit Molekülen der extrazellulären Matrix verbinden. Integrine eignen sich ideal für die Regulation von Adhäsionsprozessen, denn sie können in einer inaktiven Form und einer aktiven Form vorliegen. Die Transposition zwischen beiden Formen kann durch intrazelluläre Signalprozesse, die z. B. durch die Stimulation von Chemokinrezeptoren ausgelöst werden, gesteuert werden. Im nicht aktivierten Zustand binden die Integrine nur sehr schwach. Die Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit den Chemokinen ist also notwendig, damit die Integrine in die Lage versetzt werden, die neutrophilen Granulozyten effizient an die Endotheloberfläche anzubinden und ihnen die gerichtete Wanderung zu ermöglichen.

Die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch Chemokine führt nicht nur zur Aktivierung der Integrine, sondern startet eine ganze Fülle von intrazellulären Prozessen, die das Abflachen des neutrophilen Granulozyten auf der Gefäßwand zur Folge haben und Umbauvorgänge des Zytoskeletts einleiten, die es der Zelle ermöglichen, die Endotheloberfläche entlangzuwandern.

Die Rolle von neutrophilen Granulozyten in der Immunglobulin E-vermittelten allergischen Entzündung ist bis heute nicht geklärt. Die neutrophilen Granulozyten sind neben den Schleimhautepithelien die primären Zielzellen für exogene entzündungsfördernde Reize, sie sezernieren Enzyme, produzieren Sauerstoffradikale wie von BAGGIOLINI beschrieben [12] und phagozytieren Bakterien und kleine Partikel, aber auch Immunkomplexe. Sie schützen den

Körper vor Besiedlung und Ausbreitung von Pilzen und Bakterien. Sie haben einen Durchmesser von 10-15 μm , werden im Knochenmark gebildet [14], besitzen eine relativ kurze Halbwertszeit im Blutkreislauf von acht bis zwanzig Stunden und werden in der Milz, aber auch in Leber und Knochenmark abgebaut. Bei Patienten mit atopischem Ekzem sind besonders bei bakterieller Superinfektionen der Haut viele neutrophile Granulozyten in der Epidermis nachzuweisen [103]. Neutrophile Granulozyten sind in der nasalen Lavage von sensibilisierten Patienten nach Allergenstimulation [175] und in der bronchialen Lavage von Asthmatikern [133; 227] in größerer Anzahl nachgewiesen worden. Bis jetzt sind drei IgE-Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten entdeckt worden: Mac-2/ ϵ BP [234] und der niedrigaffine Rezeptor für IgE (Fc ϵ RII/CD23) [248]. Neueste Untersuchungen zeigen, daß die neutrophilen Granulozyten von Asthmatikern den hochaffinen IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) exprimieren [91]. Neben den oben genannten Adhäsionsmolekülen besitzt die Zellmembran der PMN Rezeptoren für Interleukin-8 [1], Leukotrien B₄ (LTB₄) [56], Prostaglandin E₂ (PGE₂) [247], Platelet-Activating Factor [219], LPS [97], Immunglobulin G [142] und Rezeptoren für die NADPH-abhängige Atmungskette [228] (*Abb. 1.4-1*).

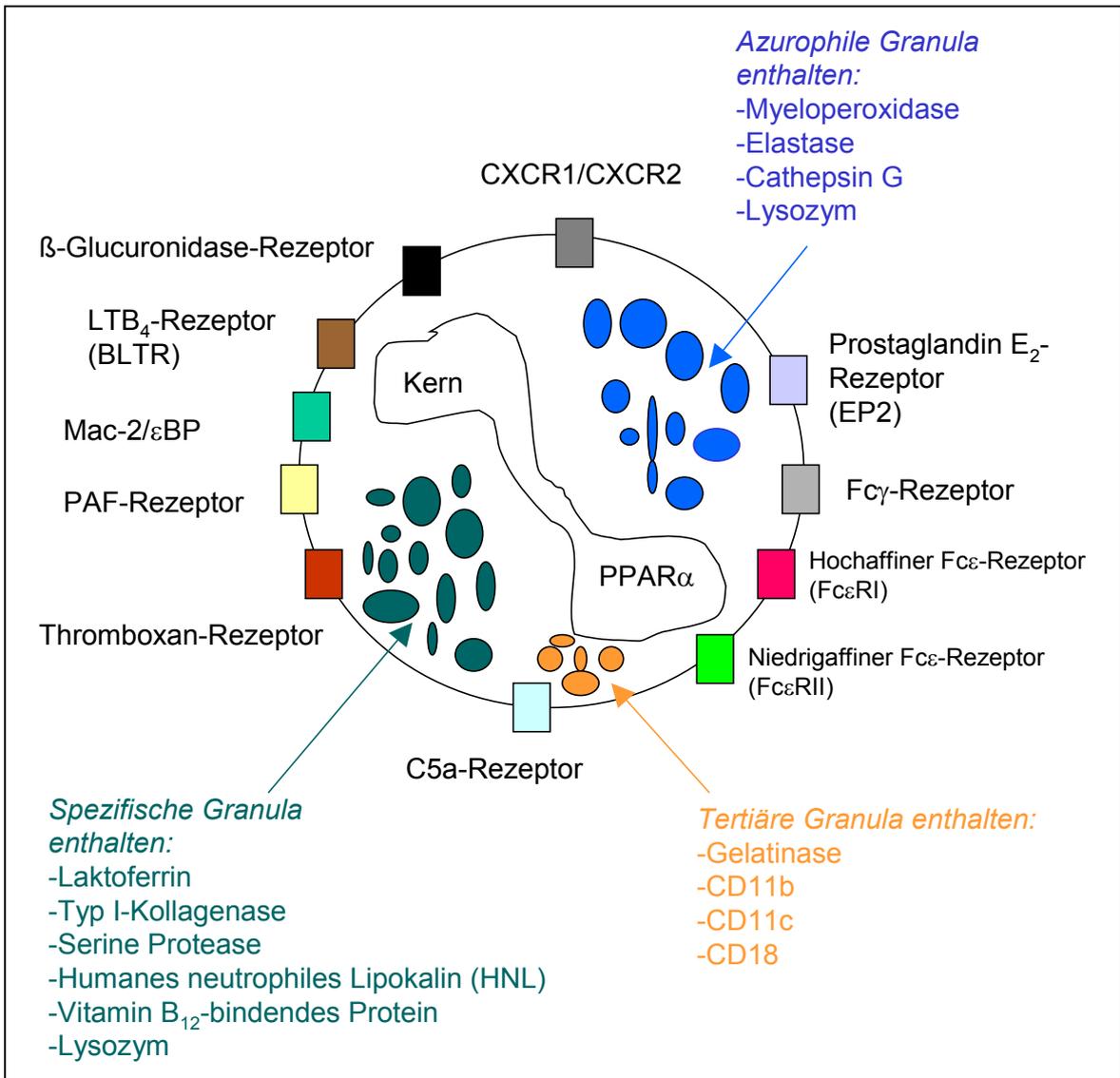


Abb. 1.4-1 Rezeptoren und Granula der neutrophilen Granulozyten

PMN besitzen neben azurophilen Granula spezifische cytoplasmatische und tertiäre Granula: Die azurophilen Granula entstehen schon im Promyelozyt-Stadium und enthalten Myeloperoxidase, wohingegen die spezifischen Granula erst im Myelozyt-Stadium gebildet werden und Myeloperoxidase-negativ sind [14]. Azurophile Granula enthalten neben der Myeloperoxidase (MPO), Säurehydrolasen, Elastase, Cathepsin G und Lysozym. MPO wurde erstmalig 1965 in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen [207]. Dieses Enzym hat eine starke bakteriotoxische Wirkung.

In den spezifischen Granula sind Laktoferrin, Vitamin-B₁₂-bindendes Protein, Typ I-Kollagenase und Serine-Protease sowie Humanes Neutrophiles Lipokalin (HNL) lokalisiert. Letzteres ist ein Protein, das zur Gruppe der Lipokaline gehört [39]. Die Arbeitsgruppe von VENGE et al. [5; 239] konnte kürzlich zeigen, daß HNL ein guter Marker der Neutrophilen-Aktivierung ist, da er eine geringere Variabilität in den gemessenen Konzentrationen zeigt als MPO und deswegen gegenüber MPO-Messungen überlegen ist. Die spezifischen Granula enthalten ebenso wie die azurophilen Granula Lysozym (*Abb. 1.4-1*). Ende der siebziger Jahre wurde durch genauere Fraktionierungsmethoden ein dritter Granulatyp entdeckt: die tertiären Gelatinase-enthaltenden Granula [83; 188], und Ende der achtziger Jahre konnte durch Immunpräzipitationsstudien gezeigt werden, daß in der Membran der tertiären Granula die Adhäsionsmoleküle CD11b, CD11c und CD18 enthalten sind [130]. Neben Gelatinase enthalten diese Granula Diacylglycerollipase, Acetyl-CoA-lyso PAF Acetyltransferase, Gelatinase, β -Glucuronidase, β_2 -Microglobulin und Diaminooxidase.

1.4.1 Beschreibung von Mediatoren, die aus PMN freigesetzt werden sowie von Mediatoren, die die PMN aktivieren

Wie in *Abbildung 1.4-1* dargestellt, besitzen neutrophile Granulozyten Rezeptoren für eine Reihe von Substanzen bzw. Moleküle, so beispielsweise für Leukotrien B₄ (LTB₄), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-1 (IL-1), Platelet Activating Factor (PAF), Histamin, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interferon- γ (INF- γ), Komplementfaktor C5a und Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating-Faktor (GM-CSF) aktiviert. Die Mediatoren werden im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

Leukotrien B₄

Leukotrien B₄ (LTB₄) besitzt ein Molekulargewicht von 336,5 kDa und ist ein starker chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten [77]. LTB₄ führt zur Adhäsion der neutrophilen Granulozyten [171] und fördert die transendotheliale Migration der Zellen [166]. GOLDMAN und GOETZL haben zwei Klassen von LTB₄-Rezeptoren auf PMN nachgewiesen, einen hochaffin und einen niedrigaffin bindenden Rezeptor. LTB₄-Bindung am hochaffinen Rezeptor führt zur Aggregation und Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten, Bindung am niedrigaffinen ist verantwortlich für Degranulation, Freisetzung von lysosomalen Enzymen [85] und Mobilisierung von Kalzium [86]. LTB₄ aktiviert die PMN durch Bindung am Oberflächenrezeptor (BLTR=leukotriene B₄ receptor) [3]. LTB₄ bindet aber auch am intranukleären Transskriptionsfaktor (PPAR α), der Gene aktiviert, die für inflammatorische Proteine codieren (*Abb. 1.4-1*) [60]. LTB₄ führt darüber hinaus zur Sauerstoffproduktion [172] aus PMN.

Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) gehört zu den stärksten proinflammatorischen Chemokinen. Die Chemokine werden in zwei Linien gegliedert, C-C und C-X-C-Familie, entsprechend der Nachbarschaft der ersten beiden Cysteinreste. Interleukin-8 gehört zur C-X-C-Familie. Es handelt sich um ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa, das bei neutrophilen Granulozyten eine Chemotaxis, Freisetzung von Enzymen und Produktion von Sauerstoffradikalen bewirkt, wie von BAGGIOLINI ausführlich untersucht [11; 13]. Die PMN selbst können aber auch IL-8 freisetzen, es liegt somit ein autokriner Mechanismus vor. Neben IL-8 selbst können auch LPS [226] und Zymosan, IL-1 und TNF α eine Freisetzung von IL-8 aus neutrophilen Granulozyten bewirken. Die neutrophilen Granulozyten lagern sich nach Stimulierung durch IL-8 mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) am Endothel an (Sticking). Die Freisetzung von Interleukin-8 korreliert mit der Anzahl von Granulozyten auf der Nasenschleimhaut [8]. Nach nasaler Allergenstimulation kommt es zur Freisetzung von IL-8 durch Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [110]. Bei Untersuchungen des Nasensekretes von Patienten mit allergischer Rhinitis fand man signifikant erhöhte Werte von IL-8

(Pollinotiker 465 ± 38 pg/ml, Kontrollpersonen 85 ± 16 pg/ml) [9]. POULSEN et al. [182] wiesen nach Allergenexposition erhöhte Interleukin-8 und MPO-Konzentrationen in der nasalen Lavage bei Patienten mit allergischer Rhinitis nach.

Interleukin-1

IL-1 alpha (31 kDa und 17 kDa) sowie IL-1 beta (17 kDa) sind pyrogene Proteine, die aus Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden [231]. Neben immungenen Wirkungen wie Fieber und Schmerzregulation [63] verstärkt IL-1 die Degranulation der PMN, die Thromboxan A₂-Freisetzung aus PMN und die Rekrutierung von PMN aus dem Knochenmark [186].

Platelet-Activating Factor

Der Platelet-Activating Factor (PAF) ist ein 43 kDa großes Phospholipid [119] mit starken biologischen Mediatoreigenschaften [140]. PAF wird in den Zellen nicht gespeichert, aber bei Bedarf von neutrophilen Granulozyten [139], Monozyten [2], Mastzellen [150] und Gefäßendothelzellen [184] gebildet und freigesetzt. PAF löst eine Bronchokonstriktion [238], Steigerung der Gefäßpermeabilität [40] und Senkung des Blutdrucks [40] aus.

Histamin

Auf neutrophilen Granulozyten ist sowohl der Histamin-1 (H₁)- wie auch der Histamin-2 (H₂)-Rezeptor vorhanden. Bindung am H₁-Rezeptor führt zur Steigerung der Chemokinese [208]. Bindung am H₂-Rezeptor führt bei neutrophilen Granulozyten ebenfalls zur verstärkten Chemokinese und zum Anstieg des intrazellulären Kalziums, aber Chemotaxis und Degranulation werden reduziert [209].

Tumor-Nekrose-Faktor

GREEN et al. entdeckten 1976 eine Substanz, die zur Nekrose von Tumorzellen führte und bezeichneten diese als Tumor-Nekrose-Faktor [93]. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) ist ein 45 kDa großes inflammatorisches Cytokin, das von Makrophagen und Monozyten während der akuten Entzündungsphase produziert wird [107]. TNF β besitzt ein Molekulargewicht von 24 kDa, wurde früher als Lymphotoxin bezeichnet und verursacht eine Hyperkalzämie [109]. TNF α löst Adhärenz, Phagozytose, Produktion von Sauerstoffradikalen und Degranulation der PMN aus. TNF und IL-1 bewirken eine Stimulierung der T-Lymphozyten und Endothelzellen, was zur Expressierung von den Adhäsionsmolekülen E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 führt, wodurch Zellen in Gewebe eingeschleust werden können [9].

γ -Interferon

Das intrazellär vorhandene *γ -Interferon* (IFN γ) besitzt ein Molekulargewicht von 25 bzw. 20 kDa und das extrazelluläre IFN γ hat eine Größe von 50 bzw. 25 kDa. IFN γ wird aus T-Lymphozyten freigesetzt und weil es in die Replikation von Viren eingreift (interfere), wurde es Interferon genannt. In neutrophilen Granulozyten führt γ -Interferon zur Expression von Fc γ RI (hochaffiner Rezeptor für IgG), steigert die Produktion von Sauerstoffradikalen und führt zur selektiven Stimulation der Proteinbiosynthese [45]. Bei Makrophagen steigert IFN γ die Fähigkeit der Zellen, eine Vielzahl von pathogenen Keimen (Toxoplasmodien, Listerien und Salmonellen) zu töten [57].

C5a

C5a ist ein Spaltprodukt der Komplementaktivierung. C5a wurde 1962 von BOYDEN als eine hitzestabile chemotaktische Substanz entdeckt. Sie entsteht im Rahmen der Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen mit Aktivierung des Komplementsystems [31]. C5a besitzt ein Molekulargewicht von 15 kDa. Auf neutrophilen Granulozyten sind ungefähr $1-3 \times 10^5$ Rezeptoren für C5a vorhanden. Der Rezeptor für C5a besitzt ein relatives Molekulargewicht von 42 bis 48 kDa und

kann durch Pertussistoxin gehemmt werden [82]. C5a induziert die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an humanen Gefäßendothelzellen [113].

Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating-Factor

GM-CSF stimuliert Wachstum und Differenzierung der Vorläuferzellen von neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten. Die reifen Granulozyten werden durch GM-CSF aktiviert, was zur Migration und Adhärenz der Zellen führt [58].

1.4.2 Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der allergischen Soforttypreaktion

Schon in den siebziger Jahren wurde die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der allergischen Soforttypreaktion diskutiert. HENSON berichtete 1972, daß die Bindung von IgG und IgA an neutrophile Granulozyten zu einer Stimulierung der Zellen mit Freisetzung von β -Glucuronidase sowie Steigerung von Adhärenz und Phagozytose führte [100]. Es konnte auch gezeigt werden, daß neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit dem Kalzium Ionophor A23187 PAF (Platelet Activating Factor) freisetzen [22]. Anfang der achtziger Jahre wurde von HENSON und BETZ die Rolle von neutrophilen Granulozyten in der allergischen Reaktion sowie der Einfluß von PAF auf diese Reaktion diskutiert [101]. BAGGIOLINI beschrieb, daß neutrophile Granulozyten, die bei einer anaphylaktischen Reaktion freigesetzten Mastzell-Granula phagozytieren [10]. Die Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen neutrophilen Granulozyten und der allergischen Reaktion gerieten in den achtziger Jahren wieder in Vergessenheit.

In den neunziger Jahren wurden neue Arbeiten vorgelegt, die den Zusammenhang zwischen PMN und Soforttyp-Allergie zum Inhalt hatten. So konnte gezeigt werden, daß der Entzündungsmediator NCA (Neutrophil Chemotactic Activity) nach Allergenprovokation bei Asthmatikern erhöht ist [7; 239]. NCA führt zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [163]. Auch in der Nasenschleimhaut von Pollinotikern sind im Vergleich zu Kontrollpersonen signifikant erhöhte Werte von NCA nachgewiesen worden [126]. Bei Patienten mit atopischem Ekzem ist die LTA₄-Hydrolase, die in neutrophilen Granulozyten die

Konversion von LTA₄ zu LTB₄ katalysiert, erhöht [169], und bei Asthmatikern ist eine gesteigerte Sauerstoffradikalbildung durch neutrophile Granulozyten beschrieben worden [229]. Auch führt monomeres IgE beispielsweise zu einem Anstieg des Kalziueinstroms bei neutrophilen Granulozyten [48]. Andere Studien haben gezeigt, daß Allergenprovokation zu einem Anstieg der Anzahl von neutrophilen Granulozyten geführt hat [148].

2. Zielsetzung der Arbeit

Die polymorphonukleären Granulozyten spielen eine Schlüsselrolle bei der Abwehr von Infektionen. Sie gelangen, chemotaktisch aktiviert, als erste Zellen an den Ort der Entzündung und phagozytieren Fremdkörper, Bakterien, Pilze und zerstörtes Gewebe. Auch im Zusammenhang mit allergischen Entzündungsreaktionen sind sie bekannt: Untersuchungen haben gezeigt, daß die Anzahl der PMN in der Nasenschleimhaut von Allergikern sowie im Sputum von Asthmatikern stark erhöht ist [72; 126].

In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob es Wechselwirkungen zwischen neutrophilen Granulozyten und Birkenpollen gibt. Speziell sollte auch erforscht werden, inwieweit Allergiker und Nicht-Allergiker hinsichtlich dieser Wechselwirkung Unterschiede aufweisen. Dabei sollte überprüft werden, ob es sich um eine Vorstimulierung der Allergiker-PMN handelt [34, 35] und welche Rolle die neutrophilen Granulozyten bei der Initialphase der allergischen Reaktion spielen. Der in der Nasenschleimhaut mögliche direkte Kontakt von Birkenpollen und neutrophilen Granulozyten wurde *in vitro* nachvollzogen. Es wurden Birkenpollen verwendet, weil Birkenpollen in Nordeuropa zu den Hauptverursachern der Rhinoconjunctivitis allergica gehören [54]. Die Wechselwirkung zwischen neutrophilen Granulozyten und Birkenpollen wurde morphologisch und funktionell charakterisiert.

Darüber hinaus wurde überprüft, welche Polleninhaltsstoffe für die Wechselwirkung zwischen neutrophilen Granulozyten und Birkenpollen verantwortlich sind. In Pollenüberständen wurden deshalb das Majorallergen Bet v 1 sowie andere, Eicosanoid-ähnliche Substanzen bestimmt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Probanden

Die Blutentnahmen erfolgten von insgesamt 28 freiwilligen Probanden im Alter zwischen 19 und 50 Jahren (28 ± 6), davon waren siebzehn Birkenpollenallergiker (29 ± 7 ; s. *Tab. 3.1.1-1*) und elf Kontrollpersonen (27 ± 5 ; s. *Tab. 3.1.1-2*,). Bei allen Probanden lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Erkältung vor und antiallergische Medikamenten waren mindestens eine Woche vor Blutentnahme abgesetzt worden. Die Untersuchung der Allergiker fand im symptomfreien Intervall statt. Da Zigarettenrauchen zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führt [237], wurden ausschließlich Nicht-Raucher in die Versuchsreihe aufgenommen.

Birkenpollenallergiker: Auswahlkriterium für die Aufnahme in die Studie war das Vorliegen von Heuschnupfen und die Sensibilisierung gegenüber Birkenpollenallergenen mit spezifischen IgE-Antikörpern von RAST-Klasse 3 oder höher ($\geq 3,50$ kU/l; vgl. *Tab. 3.1.1-1*). Spezifisches IgE für Birkenpollen (t3) wurde mit dem Pharmacia CAP System FEIA (Pharmacia, Uppsala, Schweden) quantifiziert. Die Untersuchung umfaßte acht weibliche und neun männliche Testpersonen im Alter von 22 bis 50 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 29 Jahren. Die Probanden wurden aus Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle Dermatologie und Allergologie der Universitätshautklinik Hamburg, der Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie GSF/Technische Universität München, Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Doktoranden und Kommilitonen rekrutiert. Bei vier Probanden wurde neben dem Heuschnupfen ein allergisches Asthma bronchiale und bei zwei weiteren Probanden sowohl ein allergisches Asthma bronchiale als auch ein atopisches Ekzem diagnostiziert.

Tab. 3.1-1 Klassifizierung der Birkenpollenallergiker

Name	Alter	Ge- Schlecht*	Atopie			Spezifische IgE-Antikörper t3) (Birke,		Nicht- Raucher
			Rhino- conjunctivitis allergica	Asthma bronchiale	Atop. Ekzem	RAST- Klasse	kU/l	
JA	26	m	Ja	Nein	Nein	3	11,6	Ja
CD	24	w	Ja	Nein	Nein	6	> 100	Ja
UP	34	w	Ja	Ja	Ja	3	15,0	Ja
WK	36	m	Ja	Nein	Nein	4	23,0	Ja
KBR	39	w	Ja	Nein	Nein	3	12,7	Ja
BV	29	m	Ja	Nein	Nein	4	23,4	Ja
MS	25	m	Ja	Nein	Nein	4	22,2	Ja
AB	25	m	Ja	Ja	Nein	3	9,3	Ja
IW	24	w	Ja	Nein	Nein	3	8,8	Ja
TD	22	w	Ja	Ja	Nein	4	23,0	Ja
NJ	34	m	Ja	Nein	Nein	5	63,3	Ja
CBR	22	m	Ja	Nein	Nein	4	62,7	Ja
JP	28	m	Ja	Ja	Nein	3	4,6	Ja
KW	23	w	Ja	Nein	Nein	4	42,9	Ja
KS	50	w	Ja	Ja	Ja	5	67,7	Ja
HC	27	w	Ja	Nein	Nein	4	22,9	Ja
MH	27	m	Ja	Nein	Nein	6	>100	Ja
PK	26	m	Ja	Ja	Nein	4	18,2	Ja

* m: männlich, w: weiblich

Kontrollpersonen: Als Kontrollgruppe dienten 11 Personen, die weder anamnestisch Hinweise auf irgendeine Allergie noch auf allergenspezifische IgE-Antikörper auf das Birkenpollenallergen (t3=RAST-Klasse 0) aufwiesen. Bei einem Probanden (UA) lag eine polymorphe Lichtdermatose vor. Vier der Probanden waren weiblich und sieben männlich. Das Gesamtdurchschnittsalter betrug 27 Jahre. Das Alter dieser Personengruppe reichte vom 19. bis zum 37. Lebensjahr. Die Kontrollpersonen setzten sich aus Mitarbeitern der Klinischen Kooperationsgruppe, Umweltdermatologie und Allergologie GSF/Technische Universität München, Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie und aus Doktoranden und Kommilitonen zusammen. Bei keiner Kontrollperson fanden sich Hinweise auf das Vorliegen einer atopischen Diathese, deren Erkennung die Definition des Begriffs Atopie nach RING [195] zugrunde lag.

Tab. 3.1-2 Übersicht über Kontrollpersonen

Name	Alter	Geschlecht*	Atopie°	Spezifische IgE-Antikörper (Birke, t3)		Nicht- Raucher
			Nein	RAST- Klasse	kU/l	
JF	23	m	Nein	0	<0,35	Ja
KH	28	w	Nein	0	<0,35	Ja
AKo	25	m	Nein	0	<0,35	Ja
CF	36	m	Nein	0 #	<0,35	Ja
JFI	25	m	Nein	0	<0,35	Ja
CK	26	m	Nein	0	<0,35	Ja
UA	24	w	Nein	0	<0,35	Ja
KHe	37	m	Nein	0	<0,35	Ja
AV	19	w	Nein	0	<0,35	Ja
SG	25	m	Nein	0	<0,35	Ja
WW	26	w	Nein	0	<0,35	Ja

* m: männlich, w: weiblich

Spezifische Antikörper gegen *Dermatophagoides pteronyssinus*,
D. farinae und *D. microceras* RAST-Klasse 2

3.1.2 Pollen

<i>Betula alba</i> L. (Birkenpollen)	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA Best.-Nr. P-6770, Batch 19F0783 Allergon, Ängelholm, Schweden Best.-Nr. 0125
<i>Phleum pratense</i> L. (Lieschgraspollen)	Allergon, Ängelholm, Schweden Best.-Nr. 0113, Batch 011392101
<i>Artemisia vulgaris</i> L. (Beifußpollen)	Allergon, Ängelholm, Schweden Best.-Nr. 0101, Batch 010194102
<i>Pinus sylvestris</i> L. (Kieferpollen)	Allergon, Ängelholm, Schweden Best.-Nr. 0138, Batch 013897101

3.1.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

Chemikalien

Agar 100	Plano, Wetzlar Best.-Nr. R1031
Albumin Standard (2 mg/ml)	Pierce / Rochford, Illin., USA, Best.-Nr. 23209
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck, Deisenhofen Best.-Nr. 12018
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce / Rockford, Illin., USA Best.-Nr. 1856210
Entellan	Merck, Darmstadt Best.-Nr. 1.07960.0500
Giemsa-Lösung	Merck, Darmstadt Best.-Nr. 1.09204
Glutaraldehyd (1%)	Plano, Wetzlar Best.-Nr. R1012
Glycerin (87%)	Merck, Deisenhofen Best.-Nr. 4094
Histopaque-1077	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA Best.-Nr. 1077-1
Histopaque-1119	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA Best.-Nr. 1119-1

H ₂ O ₂ (30%)	Merck, Deisenhofen Best-Nr. 8597
IL-8 Immunoassay (human)	Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, USA Best.-Nr. D8000
KCl	Merck, Darmstadt Best-Nr. 4936
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt Best-Nr. 4873
LTB ₄ Enzymimmunoassay (EIA)	Amersham, Buckinghamshire, England Best.-Nr. RPN 223
LTC ₄ /D ₄ /E ₄ Enzymimmunoassay (EIA)	Amersham, Buckinghamshire England Best.-Nr. RPN 224
LY293111	Lilly, Greenfield, USA
May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt Best.-Nr. 1.01424.0500
MAK 2E10G6G7	Allergopharma, Reinbek (Biotinylierter Nachweis Antikörper)
MAK 3B4F11D6	Allergopharma, Reinbek (Monoklonaler Bet v 1 Antikörper)
MPO-RIA	Pharmacia, Uppsala, Schweden Best.-Nr. 10-9218-01
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt Best-Nr. 6392
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt Best-Nr. 6329
NaHPO ₄ x 12 H ₂ O	Merck, Deisenhofen Best-Nr. 6579
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Deisenhofen Best-Nr. 6580

Ortho-Phenylendiamin (OPD)	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA Best-Nr. P-8787
Osmiumtetroxid (4%)	Plano, Wetzlar, Best.-Nr. R1023
PBS ohne Ca ²⁺ , ohne Mg, ohne H ₂ CO ₃	Life technologies, Eggenstein Best.-Nr. 14190-094
PGE ₂ Enzymimmunoassay (EIA)	Amersham, Buckinghamshire, England, Best.-Nr. RPN 222
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Life technologies, Eggenstein Best.-Nr. 21875-034
Schwefelsäure (konz.)	Merck, Deisenhofen Best-Nr. 748
Streptavidin-Peroxidase (2 mg Lyo.)	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA Best-Nr. P-5512
Trypanblau	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA Best.-Nr. T-6146
TWEEN 20	Merck, Deisenhofen Best-Nr. 822184
Zitronensäure	Merck, Deisenhofen Best.-Nr. 244

Verbrauchsmaterial

EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht Best.-Nr. 02/1066.001
Ektachrome 160T Farbdiafilm	Kodak, England Best.-Nr. 9169504
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg Best.-Nr. 0030 015.002
Falcon Polypropylen-Röhrchen 15 ml/50 ml	Becton Dickinson, NJ, USA Best.-Nr. 352070 / 2096
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren Best.-Nr. MN 615 1/4, Ø 18,5 cm
Filterkarten für Zytokontainer	Schleicher & Schuell Best.-Nr. 2689D

Mikrogefäße	Heraeus, Hanau Best.-Nr. 75001153 (0,75 ml) Best.-Nr. 75001152 (1,5 ml)
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen Best.-Nr. 650061
Mikrotiterplatten für ELISA (flachbödig)	MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Dänemark Best.-Nr. 449824
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht Best.-Nr. 02.1063.500
Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore GV/Eschborn Best.-Nr. SLGV004NL
Transwell-Platten	Costar, MA, USA Best-Nr. 3421

Geräte

FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	MC1 Research, Sartorius, Göttingen
Homogenisator	Ultra Turrax T 25 basic, IKA Werke, Staufen
Elektronenmikroskop	Jeol 6300, Tokyo, Japan
Kamera	WILD MPS 52, Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Lichtmikroskop	Aristoplan, Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Multipette	Eppendorf, Hamburg
pH Meter	pH 537, WTW, Weilheim
Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Titramax 100, Heidolph, Schwabach
Spektralphotometer	DU 640, Beckman, Fullerton, USA
Waage	MC1Labor, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Typ 1003, GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Biofuge 13, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten (PMN)

Zur Isolierung von PMN wurden jeweils ca. 80 ml Vollblut aus der Armvene in EDTA-Monovetten entnommen. Weitere 9 ml wurden zur Bestimmung von spezifischen Serum-IgE-Antikörpern entnommen.

Die Isolierung der PMN erfolgte mittels Histopaque, da so die reinste PMN Fraktion ohne zusätzliche Lyse der Erythrozyten erzielt wird [70] und die PMN nicht aktiviert werden.

Es wurden vier 50 ml Polypropylen-Röhrchen für die Isolierung vorbereitet. Bei Raumtemperatur wurde in jedes Röhrchen 20 ml Vollblut pipettiert und vorsichtig mit 13 ml Histopaque-1077 unterschichtet. Dann erfolgte die äußerst vorsichtige Unterschichtung dieser beiden Phasen mit Histopaque-1119 unter Verwendung einer 20 ml-Einwegpipette. Anschließend wurden die Röhrchen bei 20°C für 45 min. bei 754 g in einer Megafuge 1.0R (1900 rpm) zentrifugiert. Die Zentrifugenbremse wurde abgestellt, da es sonst beim Bremsvorgang zu einem Vermischen der Gradienten kommt. Die Bande der polymorphonukleären Zellen befindet sich nach der Zentrifugation zwischen Histopaque-1077 und Histopaque-1119 (siehe *Abb. 3.2.1-1*). Diese Bande wurde mittels Pasteurpipette vorsichtig aspiriert und in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen resuspendiert, mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und bei 409 g (1400 rpm) und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 5 ml PBS aufgefüllt und bei 353 g (1300 rpm) für 10 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen bei 301 g (1200 rpm), unter sonst gleichen Bedingungen, wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 10 ml RPMI 1640 aufgefüllt. Die neutrophilen Granulozyten wurden unter dem Mikroskop in der Neubauer-Zählkammer (vier Großquadrate) gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^6 /ml PMN durch Zugabe von RPMI eingestellt. Die Vitalität wurde mit 0,5% Trypanblau in PBS kontrolliert und lag bei $98\% \pm 2\%$. Die Reinheit der PMN betrug $72\% \pm 5\%$.

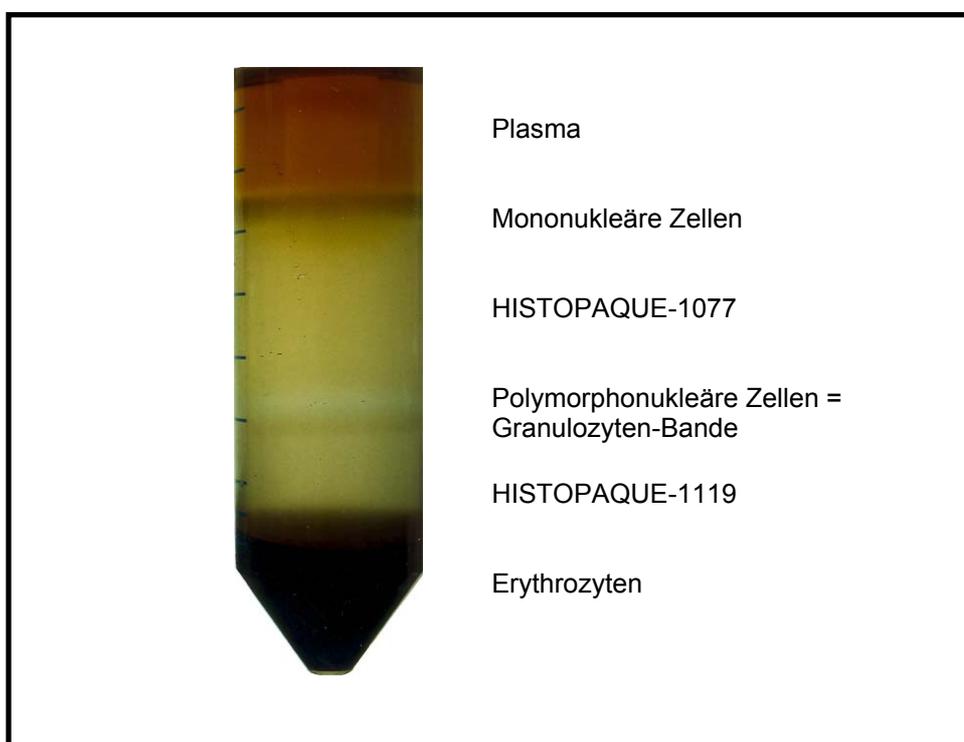


Abb. 3.2.1-1 Isolierung der neutrophilen Granulozyten durch Verwendung von zwei Dichtegradienten (Histopaque-1077 und Histopaque-1119).

3.2.2 Inkubationsansätze von PMN und Birkenpollen

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen neutrophilen Granulozyten und Birkenpollen wurden 1×10^6 PMN/ml und 1×10^5 Birkenpollen/ml (entsprechend 160 Birkenpollen/1 μg Birkenpollen nach Brown [36]) im Schüttelwasserbad bei 37°C in Eppendorf-Tubes inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 30, 60, 120 bzw. 300 Minuten, und die Proben wurden nach Ablauf in der bei 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Megafuge 1.0R) 5 Minuten bei 1000 rpm (209 g) zentrifugiert. Die Überstände wurden entnommen und zur kompletten Elimination von Pollen 5 Minuten erneut zentrifugiert (13.000 rpm \approx 16.060g, Biofuge 13, 4°C). Diese pollenfreien Überstände wurden abpipettiert und bei -20°C eingefroren bis zur weiteren Verwendung.

Vorinkubation der neutrophilen Granulozyten mit einem selektiven LTB_4 -Rezeptor Antagonisten (LY293111)

Zur Untersuchung der Wirkung eines selektiven LTB_4 -Rezeptor-Antagonisten auf die Pollen-Neutrophilen-Interaktion wurden die neutrophilen Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad mit 4 nM (2,16 ng/ml) Leukotrien-Rezeptor-Antagonist LY293111 (Lilly, Greenfield, USA) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Birkenpollen wie beschrieben.

3.2.3 Inkubation der Pollen

Birkenpollen

Zur Untersuchung der Freisetzung von biologisch aktiven Substanzen aus Birkenpollen wurden 1×10^6 Birkenpollen/ml RPMI 1640 ohne L-Glutamin (=6,25 μg Pollen nach BROWN [36]) bzw. 10 mg Birkenpollen/ml PBS (=1,6 $\times 10^6$ Birkenpollen/ml) suspendiert und 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Dabei wurde der pH-Wert des Puffers (pH 6,0/pH 7,4/pH 9,0) bzw. die Temperatur des Schüttelwasserbades ($4^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}/37^\circ\text{C}$) variiert. Zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit wurden die Pollen für 0, 1, 5, 10, 30, 120 und 300 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und die Überstände nach Ablauf der Inkubationszeit auf ihren Gehalt an LTB_4 , PGE_2 sowie Gesamtprotein- und

Majorallergen-Gehalt (Bet v 1) untersucht. Um die Dosisabhängigkeit der Wirkung nachzuweisen, wurden 0, 1×10^4 , 2×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 1×10^6 und 2×10^6 Birkenpollen/ml in Suspension gebracht und nach 30-minütiger Inkubationszeit der Gehalt an LTB₄ und PGE₂ im Überstand mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt.

Vergleich verschiedener Pollenarten

Zum Vergleich von verschiedenen Pollenarten wurden je 10 mg von *Betula alba* L. (Birkenpollen), *Phleum pratense* L. (Lieschgraspollen), *Artemisia vulgaris* L. (Beifußpollen) und *Pinus sylvestris* L. (Kieferpollen) für 30 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Weiterverarbeitung der Proben gleichermaßen: Zentrifugation der Proben in der vorgekühlten Megafuge 1.0R (4°C, 5 Minuten, 145 g), Abnahme der Überstände und Zentrifugation in der Biofuge 13 für 3 min. bei 13.000 rpm (16.060g) und Raumtemperatur zur Herstellung pollenfreier Überstände. Anschließend wurden die neuen Überstände abpipettiert und bei -20°C eingefroren.

3.3 Morphologische Methoden

Herstellung der Zytopräparate und Färbung nach Pappenheim:

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung der Wechselwirkung zwischen PMN und Pollen wurden nach der Inkubation Zytopräparate hergestellt. Von den Zellsuspensionen wurde ein Aliquot (200 µl, entsprechend 2×10^5 PMN) entnommen, und in Anwesenheit von 0,01% BSA Zytopräparate in der Megafuge 1.0R (500 rpm=43g, 5 Minuten, RT) hergestellt. Die Fixierung der Präparate erfolgte mittels Formaldehyddampf, gefolgt von panoptischer Färbung nach Pappenheim: Färbung mit May-Grünwaldt-Lösung (Merck, Darmstadt) für 3 Minuten, anschließend Abspülen der Objektträger mit Aqua bidest., 3 Minuten danach Waschen in frischem Aqua bidest. und 15 Minuten Färben mit Giemsalösung (1:20 verdünnt mit Weisescher Pufferlösung; Kaliumdihydrogenphosphat 0,49 g, di-Natr. hydr. phosphat x 2 H₂O 1,14 g, gereinigtes Wasser ad 1000,00 g), dann abspülen unter Leitungswasser und Eindeckeln mit

Entellan. Es wurden pro Versuchsansatz acht Objektträger hergestellt. Die Objektträger wurden im Leitz (SM-LUX)-Lichtmikroskop untersucht. Zur Dokumentation wurden Diabilder mit einer Leica-Leitz Kamera angefertigt, wobei Kodak Ektachrome 160T für Farbdibilder verwendet wurden.

Morphometrie:

Zur quantitativen Auswertung der Adhärenz der neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen wurden je Objektträger 100 Birkenpollen ausgezählt. Die Adhärenz der PMN an Pollen wurde in Klassen von 0 bis III eingeteilt. Bei Klasse 0 waren die Birkenpollen PMN-frei. Neben der Zahl adhärenter Zellen wurde darüber hinaus nach ausläuferbildenden (b) und nicht-ausläuferbildenden (a) Zellen diskriminiert (vgl. *Tab. 3.3-1*).

<i>Tab. 3.3-1</i> Klasseneinteilung der Wechselwirkung von PM/Birkenpollen (Klasse 0 bis III) und Ausbildung einer 'Führenden Lamelle' (a/b)				
Adhärenz-Klasse	0	Ia/Ib*	IIa/IIb*	IIIa/IIIb*
Morphologie	keine Adhärenz der PMN	1 adhärenter PMN	2 bis 3 adhärente PMN	> 3 adhärente PMN

- * a) neutrophile Granulozyten ohne führende Lamelle
- b) neutrophile Granulozyten mit führender Lamelle

Elektronenmikroskopie:

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Glutaraldehyd-fixierte Ausstrichpräparate mit Osmiumtetroxid nachfixiert, über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, mit Hexamethyldisilazan (HMDS) und Kohlendioxid getrocknet, mit Gold besputtert und im Raster-Elektronenmikroskop der Firma Jeol analysiert. Die Präparation und Durchführung erfolgte freundlicherweise durch Drs. Tomczok und I. Dosch.

3.4 Bestimmung von MPO, HNL und IL-8 in Überständen von PMN-Pollen-Suspension

Um die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch Pollen nachzuweisen, wurde im Überstand der PMN-Pollen-Suspension die Messung von Myeloperoxidase (MPO), HNL (Humanes Neutrophiles Lipokalin) und Interleukin-8 (IL-8) vorgenommen.

Bestimmung der Myeloperoxidase

Die MPO-Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten wurde mittels Radioimmunoassay (RIA, Pharmacia) gemessen. Die Messung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung und je Probe wurde 50 µl Überstand verwendet.

Bestimmung des Humanen Neutrophilen Lipokalins

Die Bestimmung des spezifischen Neutrophilen-Markers Humanes Neutrophiles Lipokalin (HNL) wurde freundlicherweise von Professor Per Venge (Universität Uppsala, Schweden) vorgenommen. Die Messung der Proben erfolgte mittels ELISA in Doppelbestimmung und je Probe wurde 50 µl Probe verwendet. Kreuzreaktivitäten mit MPO, Elastase, Laktoferrin und Kathepsin G sind mit <0,8% angegeben.

Bestimmung von Interleukin-8

Die Interleukin-8-Freisetzung wurde im Überstand der mit Birkenpollen inkubierten neutrophilen Granulozyten mittels eines ELISA (Quantikine) gemessen. Die

Messung der Proben erfolgte in Doppelbestimmung und je Probe wurden 100 µl verwendet. Für diesen ELISA sind keine signifikanten Kreuzreaktionen nachgewiesen worden.

3.5 Bestimmung von Gesamtprotein und Majorallergen Bet v 1 in Pollenüberständen

Gesamtprotein-Bestimmung

Die Proteinmessung erfolgte spektralphotometrisch bei 595 nm nach der Methode von Bradford [32]. Dabei wurden 100 µl Probe mit 100 µl des Coomassie® Plus Protein Assay Reagent versetzt und die Extinktion gemessen. Als Leerwert kam *Aqua bidest.* entsprechend mit dem Protein Reagenz versetzt zum Einsatz. Zur Kalibrierung des Photometers wurde eine Standardreihe (2,5 bis 40 g/ml) aus einer kommerziell erhältlichen Standard Protein Lösung (2 mg/ml Albumin; Pierce) erstellt.

Bestimmung des Majorallergens der Birke (Bet v 1)

Die Quantifizierung von Bet v 1 in den Pollenüberständen erfolgte mittels eines spezifischen ELISA, dessen Reagentien freundlicherweise von Professor Fiebig, Allergopharma, Reinbek, zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wird zunächst ein für das zu quantifizierende Allergen spezifischer monoklonaler Antikörper (MAK) an eine Mikrotiterplatte gekoppelt [202]. Nach Inkubation mit der Probe bleibt das Allergen am Antikörper gebunden. Durch einen zweiten Allergen-spezifischen MAK, der biotinyliert ist, wird das gebundene Allergen nachgewiesen. Über das Biotin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex an den Nachweis-MAK gebunden. Bei Zugabe eines Substrates wird durch das Enzym eine Reaktion katalysiert, die zu einer Färbung führt. Als Standard wird gereinigtes Allergen (Bet v 1) verwendet. Die Färbeintensität ist der gebundenen Menge Allergen proportional. Der Nachweis erfolgt im Photometer.

Durchführung: Flachbödige Mikrotiterplatten wurden mit dem monoklonalen Bet v 1-Antikörper (MAK 3B4F11D6 10 µg/ml Carbonat-Puffer) bei 4°C über Nacht inkubiert, wodurch es zu einer Bindung des Antikörpers an die Platte kommt. Es wird eine Allergenverdünnungsreihe mit Bet v 1 angefertigt und 100 µl/well

eingefüllt und 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Der biotinylierte Nachweis-Antikörper (MAK 2E10G6G, 1:15000) wird in die Wells eingefüllt und es erfolgt eine 1-stündige Inkubation bei RT auf dem Schüttler. Peroxidase-konjugiertes Streptavidin (1:2000) wird in die Wells pipettiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Substratlösung hinzugefügt, unter Lichtschutz 10 Minuten inkubiert, und mit der Stopplösung wird die Reaktion unterbrochen. Die Messung erfolgt bei 492 nm und die Extinktion der Standardkurve sollte zwischen 1,5 und 2,0 OD liegen. Bei der Auswertung ist der Meßbereich so festzulegen, daß im linearen Bereich der Standardkurve gemessen wird.

3.6 Bestimmung von Lipidmediatoren (LTB₄, LTC₄/D₄/E₄, PGE₂) in Pollenüberständen

Bestimmung von Leukotrien B₄

Die Konzentration an LTB₄ wurde mittels eines ELISA (Amersham, Buckinghamshire, England) im Überstand der PMN-Pollen-Suspension gemessen. Bei dem von uns verwendeten LTB₄-ELISA wurden Doppelwerte bestimmt und jeweils 50 µl Probe verwendet. LTB₄-Kreuzreaktivität mit 20-OH-LTB₄: 2,5% und mit 6-trans-LTB₄: 16,6%.

Bestimmung von Cysteinyl-Leukotrienen (LTC₄/LTD₄/LTE₄)

Die Messung der Cysteinyl-Leukotriene wurde im Überstand der Pollensuspension mittels eines ELISA (Amersham, Buckinghamshire, England) bestimmt. Doppelbestimmungen und Probenmengen waren wie bei der LTB₄-Bestimmung.

Bestimmung von Prostaglandin E₂

PGE₂ wurde im Überstand der Neutrophilen-Pollen-Suspension mittels eines ELISA (Amersham, Buckinghamshire, England) bestimmt. Doppelbestimmung und Probenmenge waren wie bei der LTB₄-Bestimmung. An Kreuzreaktivitäten in diesem ELISA wurden genannt: PGE₁ (7,0%), 6-keto-PGE_{1α} (5,4%), PGF_{2α} (4,3%) und PGD₂ (1%).

3.7 Migrationsassay

Zur Bestimmung der migratorischen Aktivität von PMN wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dazu wurden 1×10^5 PMN/100 μl (wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben) isoliert, in eine Transwell-Zellkulturschaleneinsatz pipettiert und bei einer Flußgeschwindigkeit von 60 $\mu\text{l}/\text{Minute}$ die Anzahl der durch die 5 μm -Poren der Transwell-Membran migrierten neutrophilen Granulozyten im FACSCalibur (FACS=Floureszenz-Activated Cell Sorter; Becton Dickinson) bestimmt. Als Positivkontrolle wurde das typische Chemoattraktans Leukotrien B₄ (3.9×10^{-10} M) und als Negativkontrolle Medium (RPMI 1640) verwendet. Um die chemotaktische Wirkung von Birkenpollen-Inhaltsstoffen zu überprüfen, wurden 2,04 mg Pollen/600 μl Medium verwendet. Zur Hemmung der Chemotaxis wurden die neutrophilen Granulozyten mit einem selektiven Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (LY293111, 40 μM) vorinkubiert (15 Minuten auf Eis, 15 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad, vgl. Kap. 3.2.2) und der Chemotaxis-Versuch wie oben beschrieben durchgeführt.

3.8 Isolierung von 13-HODE und 13-HOTE aus Birkenpollen und Nachweis mittels HPLC

Die oxidierten Fettsäuren 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE) und 13-Hydroxyoctatetraensäure (13-HOTE) wurden nach der Methode von WEICHERT et al. [243]. extrahiert. Zu 2 g Birkenpollen wurden 30 ml Extraktionsmedium (Isohexan-Isopropanol 3:2 mit 0,0025% Butyl-Hydroxy-Toluol) und 150 μl 1 mol/Liter HCl wurden hinzugegen und sofortige Homogenisierung erfolgte mit Ultra Turrax (T 25 basic, IKA-Werke, Staufen) für 30 Sekunden. Das Extrakt wurde 10 Minuten bei 4500 g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde noch 3-malig mit 3 ml Extraktionspuffer extrahiert. Zur kombinierten organischen Phase wurde 6,7-prozentige Kaliumsulfat-Lösung hinzugefügt, so daß ein Gesamtvolumen von 47 ml erreicht wurde. Die obere Hexan-reiche Phase wurde abgenommen. Die untere organische Phase mit den oxidierten Fettsäurederivaten wurde getrocknet und in

1 ml Methanol/Wasser/Azetatsäure (85:15:0,1) gelöst und bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Die HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie=Hochleistungs-Flüssigchromatographie) wurde freundlicherweise von PD Dr. Ivo Feußner, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben vorgenommen [145]. Die Chromatographie ist eine physikalische Trennmethode, bei welcher die zu trennenden Komponenten zwischen zwei Phasen verteilt werden. Die eine Phase ruht und wird stationäre Phase genannt, die andere bewegt sich in eine definierte Richtung und wird mobile Phase genannt. Je nach Art der mobilen Phase unterscheidet man zwischen Gaschromatographie und Flüssigkeitschromatographie. Die HPLC-Analyse wurde mit einem Agilent 1100 HPLC System durchgeführt. Die oxidierten Fettsäuren wurden mittels Reverse Phase (RP)-HPLC aufgereinigt.

3.9 Nachweis der Lipoxygenase in Birkenpollen

150 mg Birkenpollen (Allergon) wurden 10 Minuten in Trockeneis zermörsert. Anschließend wurden 10 ml Chloroform hinzugefügt und 30 Minuten weitergemörsert. Nachfolgend wurde der Ansatz in ein 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt und für 20 Sekunden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Danach wurde die Probe 10 Minuten geschüttelt und nachfolgend bei 4000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend waren drei Schichten zu erkennen: Pollen ohne Pollenwände (1), organische Phase (2) und die Phase mit den Pollenwänden (3). Die Schichten (1) und (3) wurden abgenommen und ein Western blot angefertigt unter Verwendung eines polyklonalen primären Antikörpers aus der Gurke (freundlicherweise von PD Dr. Ivo Feußner zur Verfügung gestellt, 1:1000 verdünnt), der das Antiserum gegen die Lipidkörper der Lipoxygenase mit zwei Proteinen der Größe um 100 kDa erkennt und mit einem polyklonalen sekundären Antikörper (anti-rabbit, Boehringer; 1:5000 verdünnt). Zum Blotten wurde 5 Minuten 2,5% BSA in PBS verwendet. Mit dem primären Antikörper wurde eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend mit dem sekundären Antikörper 30 Minuten bei Raumtemperatur und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

3.10 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen bei Allergikern und Nicht-Allergikern wurde der Test auf Mittelwertsunterschiede (t-Test) verwendet. Die im Überstand der Pollen-PMN-Suspension gemessenen Konzentrationen an Interleukin-8 wurden ebenfalls bei Allergikern und Nicht-Allergikern anhand des Mann-Whitney-Wilcoxon-Tests verglichen.

Die Konzentrationen von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen, Gesamtprotein und Bet v 1 in Pollen werden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Wechselwirkung zwischen Birkenpollen und humanen PMN *in vitro*

4.1.1 Morphologie

Inkubiert man PMN von Birkenpollen-Allergikern und von Nicht-Allergikern mit Birkenpollen (im Verhältnis 10:1) *in vitro* für 30 Minuten bzw. für zwei Stunden und untersucht dann die Wechselwirkung an Zytopräparaten lichtmikroskopisch, so läßt sich das Folgende feststellen: In allen Präparaten adhärerten PMN an Pollenoberflächen, unabhängig davon, ob es sich um Zellen von Allergikern oder von Nicht-Allergikern handelt (*Abb. 4.1.1-1, Abb. 4.1.1-2*). Die Zahl adhärenter Zellen nahm mit der Dauer der Inkubation zu und war nach 120-minütiger Inkubationszeit angedeutet signifikant unterschiedlich (vgl. *Tab. 4.1.1-1b*). Dieser Unterschied ist im Wesentlichen auf Zellen zurückzuführen, die führende Lamellen, als Ausdruck chemotaktischer Aktivität, ausgebildet hatten. Zwei Stunden Inkubation von PMN mit Birkenpollen führte darüber hinaus zur Bildung von Zell-Agglomeraten um Birkenpollen (*Abb. 4.1.1-2*). Die Kerne dieser Zellen waren abgerundet und vergrößert. Nur in Einzelfällen konnte eine Destruktion der Exine und Phagozytose von Pollenwandstrukturen durch PMN beobachtet werden.

Zur genaueren Charakterisierung der Pollen/PMN-Interaktion wurde die Adhärenz der PMN an Birkenpollen, je nach Zahl adhärenter Zellen pro Pollen, in Klassen 0 bis III unterteilt. Darüber hinaus wurde innerhalb der Klassen nach Zellen ohne Ausläufer (a) und Zellen mit Ausläufern (b) differenziert. Bei dieser Einteilung wurde somit die Anzahl der adhärenter neutrophilen Granulozyten und die Existenz von führenden Lamellen miteinbezogen und überprüft, ob sich ein Unterschied im Verhalten von Zellen von Birkenpollen-Allergikern und von Nicht-Allergikern ergab (vgl. *Tab. 4.1.1-1, Abb. 4.1.1-1* und *Abb. 4.1.1-2*). Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte die am Zytopräparat erhobenen morphologischen Befunde und zeigt adhärentere, auf der Exine gelegene Zellen, ohne daß eine Destruktion der Exine nachzuweisen wäre (*Abb. 4.1.1-3*).

Tabelle 4.1.1-1a Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten (mit oder ohne führende Lamellen) an Birkenpollen: Vergleich zwischen PMN von Birkenpollen-Allergikern und Nicht-Allergikern. **Inkubationszeit von 30 Minuten.** Test auf Mittelwertsunterschiede (t-Test). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen

	Birkenpollen- Allergiker (n = 12)	Nicht- Allergiker (n = 8)	t - Test auf Unterschiedlichkeit (p)
Ausläuferbildende und nicht-ausläuferbildende PMN adhären an Birkenpollen			
Anzahl ¹	2,05 ± 0,50	2,02 ± 1,14	0,94
Anteil ² > 3	15% ± 8%	21% ± 25%	0,53
PMN ohne führende Lamelle adhären an Birkenpollen			
Anzahl ¹	1,28 ± 0,53	1,14 ± 0,51	0,59
Anteil ² > 3	7% ± 4%	8% ± 8%	0,82
PMN mit führender Lamelle adhären an Birkenpollen			
Anzahl ¹	0,77 ± 0,71	0,88 ± 0,27	0,81
Anteil ² > 3	7% ± 10%	13% ± 23%	0,46

Legende:

* knapp signifikant unterschiedlich (0,05 - 0,10)

signifikant unterschiedlich < 0,05

¹ Anzahl von PMN adhären an Birkenpollen

² Prozentualer Anteil von mehr als 3 PMN adhären an Birkenpollen

Tabelle 4.1.1-1b Anzahl adhärenter neutrophiler Granulozyten (mit oder ohne führende Lamellen) an Birkenpollen: Vergleich zwischen PMN von Birkenpollen-Allergikern und Nicht-Allergikern. **Inkubationszeit von 120 Minuten.** Test auf Mittelwertsunterschiede (t-Test). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichungen

	Birkenpollen- Allergiker (n = 8)	Nicht- Allergiker (n = 12)	t-Test auf Unterschiedlichkeit (p)
PMN mit und ohne führende Lamelle adhärent an Birkenpollen			
Anzahl ¹	2,07 ± 0,84	2,66 ± 0,80	0,14
Anteil ² > 3	18% ± 18%	35% ± 19%	0,06*
PMN ohne führende Lamelle adhärent an Birkenpollen			
Anzahl ¹	1,13 ± 0,46	1,01 ± 0,77	0,66
Anteil ² >3	9% ± 8%	11% ± 11%	0,68
PMN mit führender Lamelle adhärent an Birkenpollen			
Anzahl ¹	0,94 ± 0,61	1,65 ± 1,21	0,10*
Anteil ² > 3	9% ± 12%	24% ± 23%	0,06*

Legende:

* knapp signifikant unterschiedlich (0,05 - 0,10)
signifikant unterschiedlich < 0,05

¹ Anzahl von PMN adhärent an Birkenpollen

² Prozentualer Anteil von mehr als 3 PMN adhärent an Birkenpollen

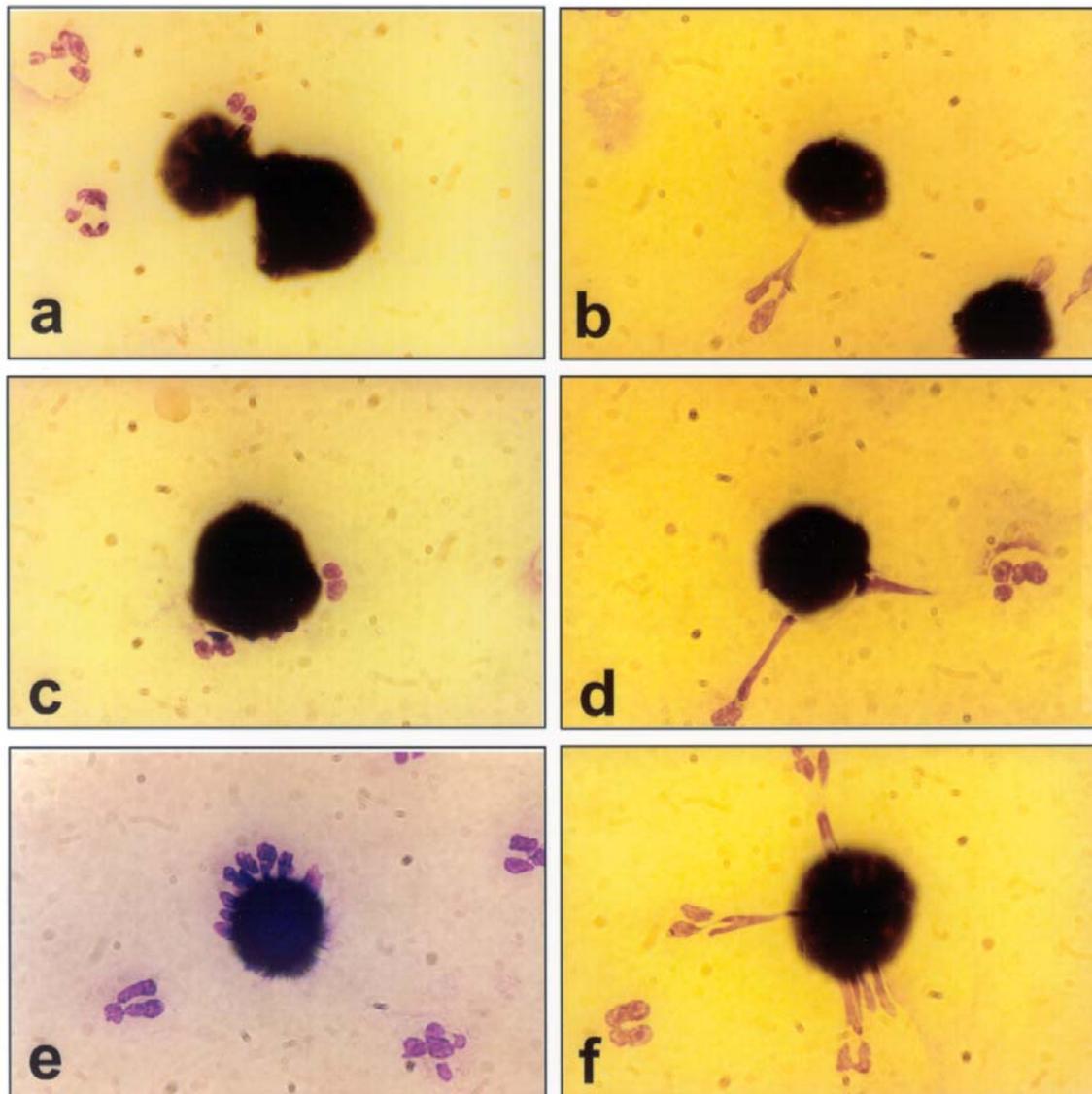


Abbildung 4.1.1-1 Adhärenz humaner PMN an Birkenpollen nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 37°C. **(a)** Adhärenz-Klasse Ia: Adhärenz eines neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen ohne Ausbildung einer führenden Lamelle; **(b)** Adhärenz-Klasse Ib: Adhärenz eines neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen mit Ausbildung einer führenden Lamelle; **(c)** Adhärenz-Klasse IIa: Adhärenz von > 1 oder < 3 neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen ohne Ausbildung von führenden Lamellen; **(d)** Adhärenz-Klasse IIb: Adhärenz von > 1 und < 3 neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen mit Ausbildung von führenden Lamellen; **(e)** Adhärenz-Klasse IIIa: Adhärenz von > 1 und < 3 neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen ohne Ausbildung von führenden Lamellen; **(f)** Adhärenz-Klasse IIIb: Adhärenz von > 3 neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen mit Ausbildung von führenden Lamellen; **(a, c, e)** PMN eines Nicht-Allergikers; **(b, d, f)** PMN eines Birkenpollen-Allergikers; **(a-f)**. Zytocentrifugenpräparate, lichtmikroskopische Aufnahmen, Vergrößerung 100x.

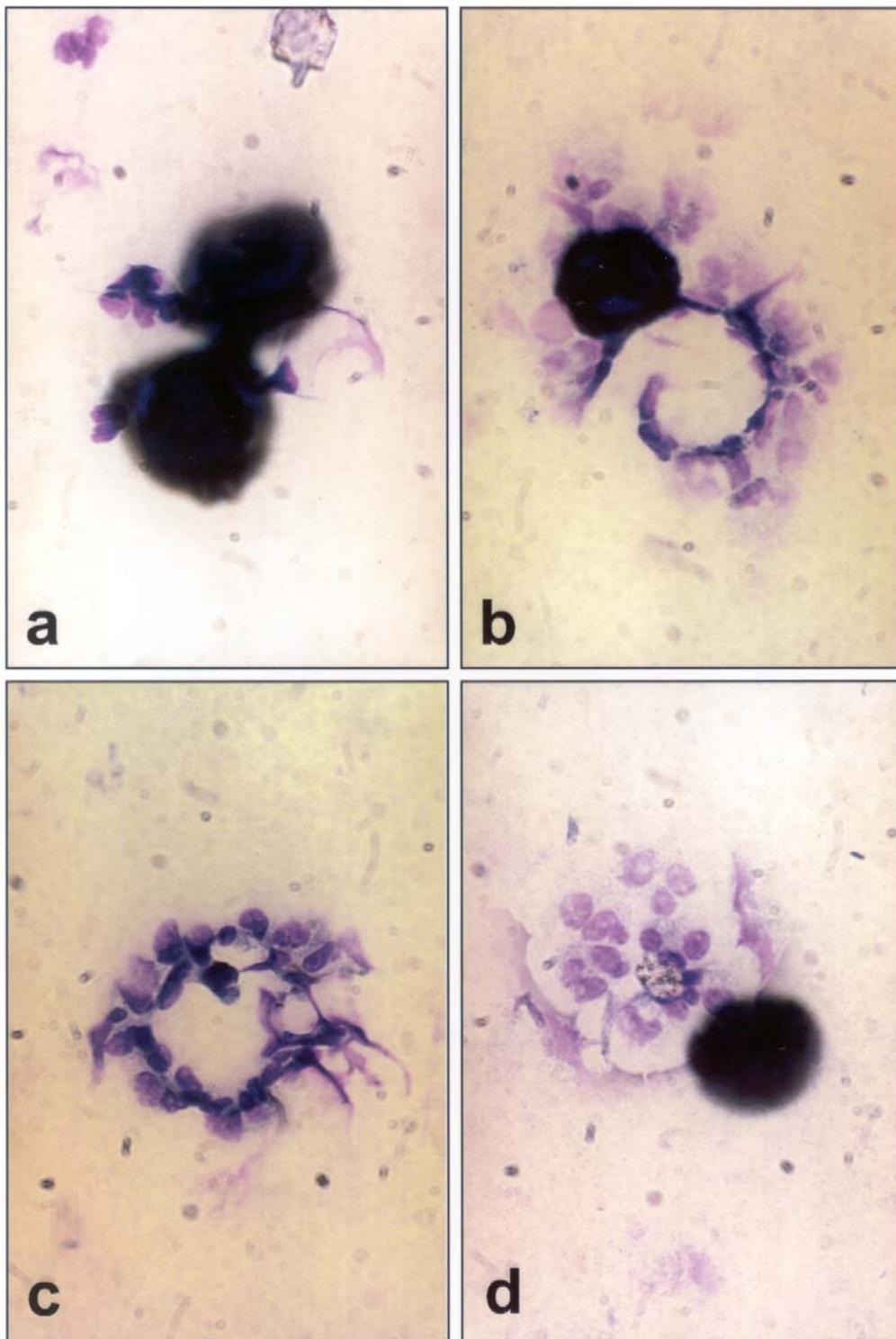


Abb. 4.1.1-2 Adhärenz-Klasse IIIb humaner neutrophiler Granulozyten, 2 Stunden Inkubationszeit, RAST-Klasse 6. (a-d) Bildung von Agglomeraten von Zellen und Birkenpollen, die teilweise aus der Präparatebene herausgelöst sind. Abrunden der Zellkerne, Auftreten von blastenähnlichen Zellen (b, d). Zytozentrifugenpräparate, lichtmikroskopische Aufnahmen, Vergrößerung 100x.

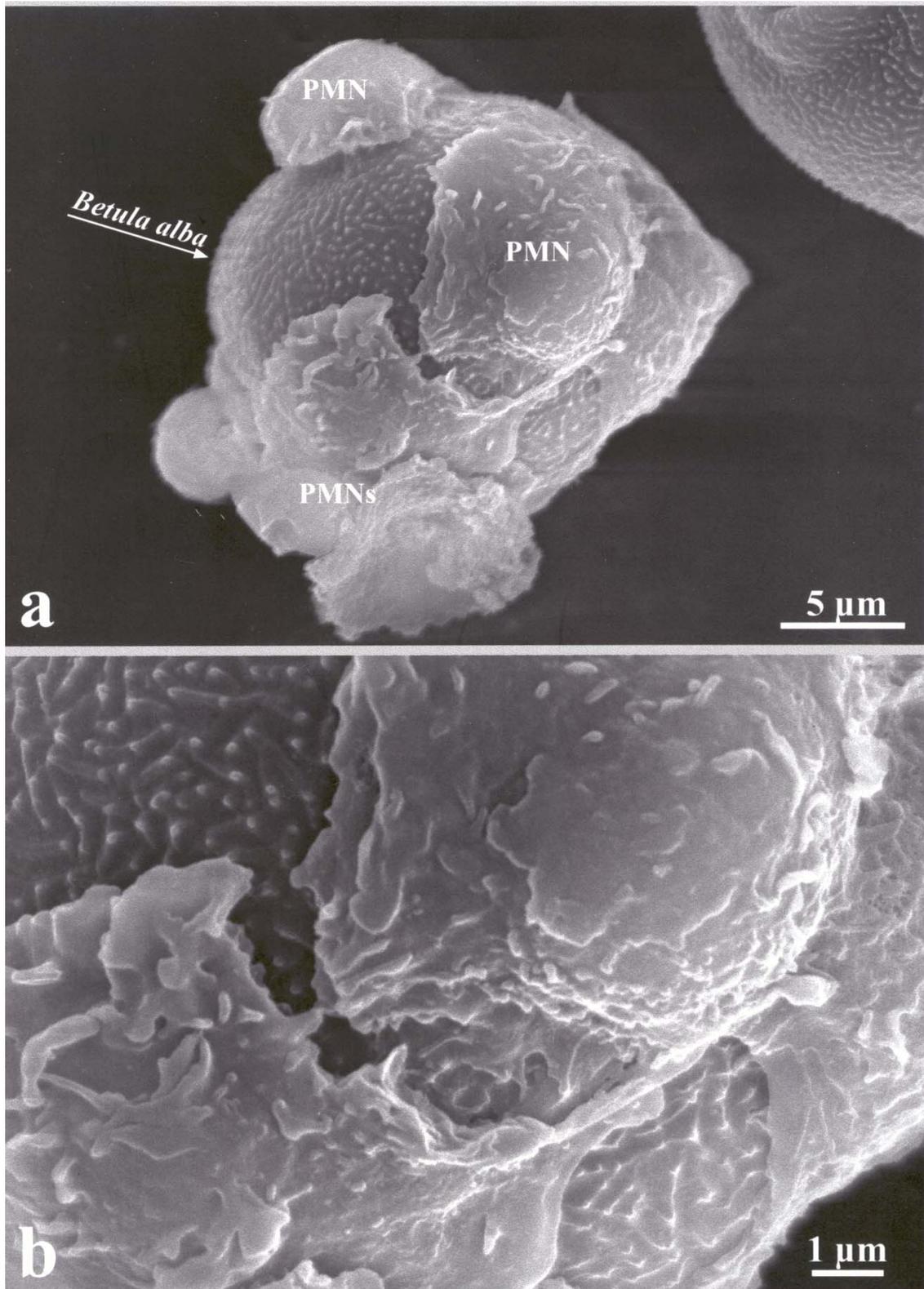


Abbildung 4.1.1-3 Rasterelektronische Aufnahmen von Birkenpollen mit auf der Exine aufsitzenden neutrophilen Granulozyten eines Birkenpollenallergikers. Ausbildung von führenden Lamellen und Spikes (b) bei insgesamt unregelmäßiger PMN-Oberfläche, kein Anhalt für Destruktion der Exine.

4.1.2 Funktionelle Parameter

Um zu prüfen, ob die beobachteten morphologischen Wechselwirkungen zwischen neutrophilen Granulozyten und Birkenpollen mit der funktionellen Aktivierung von PMN einhergehen, wurden in den Überständen von Neutrophilen-Birkenpollen-Suspensionen die PMN-Produkte Myeloperoxidase (MPO) und Humanes Neutrophiles Lipokalin (HNL) bestimmt. Unter der Frage, ob die beobachteten Formveränderungen das Ergebnis der Wirkung chemotaktischer Faktoren sind, wurden außerdem Interleukin-8 (IL-8) sowie Leukotrien B₄ (LTB₄) gemessen, das immunmodulatorische Prostaglandin E₂ (PGE₂) wurde ebenfalls quantifiziert. Zudem wurde die migratorische Aktivität der Pollensuspensionen mittels FACS bestimmt und überprüft, ob diese durch selektive LTB₄-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden kann (Kapitel 4.2.5).

4.1.2.1 Freisetzung von MPO und HNL aus humanen neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit Birkenpollen

Zur Bestimmung der Freisetzung von MPO wurden neutrophile Granulozyten (1×10^6 /ml) zwei Stunden bei 37°C (pH 7,4) mit Birkenpollen (1×10^5 /ml) inkubiert und die MPO im Überstand mittels Radioimmunoassay von 6 Birkenpollen-Allergikern gemessen. Es zeigte sich, daß aus neutrophilen Granulozyten von fünf Probanden, die mit Pollen stimuliert worden waren, im Mittel mehr MPO freigesetzt wird ($31,4 \pm 19,6 \mu\text{g MPO/l}$) als aus neutrophilen Granulozyten, die ohne Pollen inkubiert worden waren ($13,5 \pm 7,4 \text{ MPO } \mu\text{g/l}$, s. *Abbildung 4.1.2-1*).

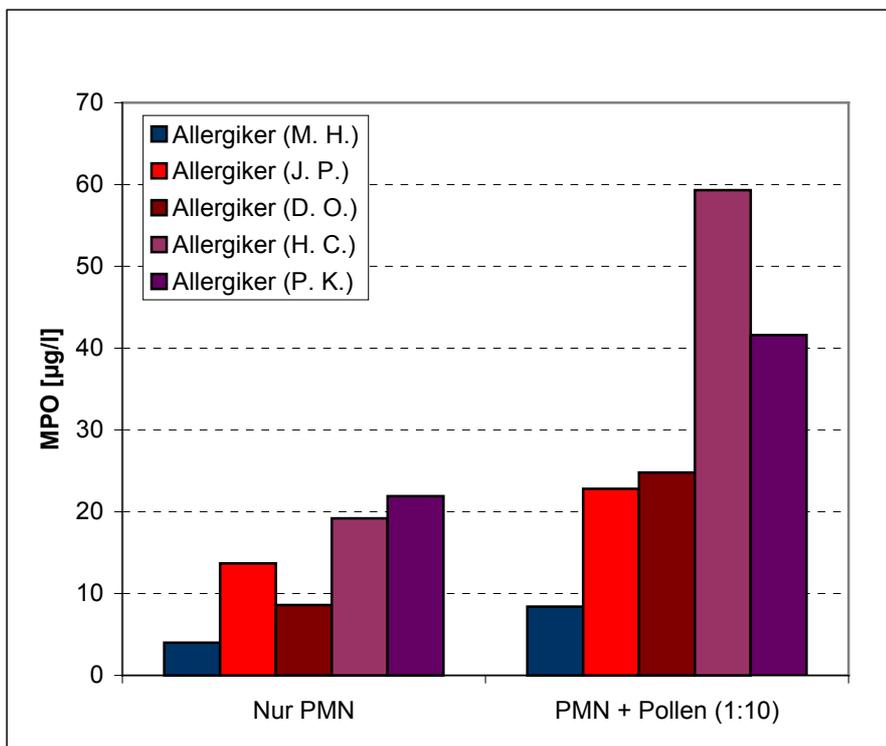


Abbildung 4.1.2-1 Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) aus neutrophilen Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) von Birkenpollen-Allergikern mit und ohne Inkubation mit Birkenpollen ($1 \times 10^5/\text{ml}$). Inkubationszeit zwei Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad (pH 7,4).

Darüber hinaus wurde der spezifische Aktivierungsmarker, das Humane Neutrophile Lipokalin (HNL) im Überstand bestimmt. HNL ist ein Transportprotein, das nur aus neutrophilen Granulozyten und keiner anderen Zellart nach Stimulation freigesetzt wird. Wie in *Abbildung 4.1.2-2* dargestellt, setzen neutrophile Granulozyten nach 2-stündiger Inkubation mit Birkenpollen im Verhältnis 10:1 HNL frei (mittlere Freisetzung $49,3 \pm 20,3 \mu\text{g/l}$ gegenüber $7,4 \pm 12,6$ in Kontrollansätzen ohne Zugabe von Pollen). Die HNL-Freisetzung aus reinen PMN-Suspensionen, ohne Zugabe von Pollen, lag zwischen $0,2 \mu\text{g/l}$ und $26,2 \mu\text{g/l}$. Nur ein Proband (HC) zeigte deutlich höhere Konzentrationen ($26,2 \mu\text{g/l}$). Insgesamt war die HNL-Freisetzung aus PMN im Mittel um das 6-fache nach Stimulation mit Birkenpollen gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Ergebnisse belegen, daß durch Pollen stimulierte PMN von Allergikern zu einer Aktivierung der Zellen mit Freisetzung von MPO und HNL führen.

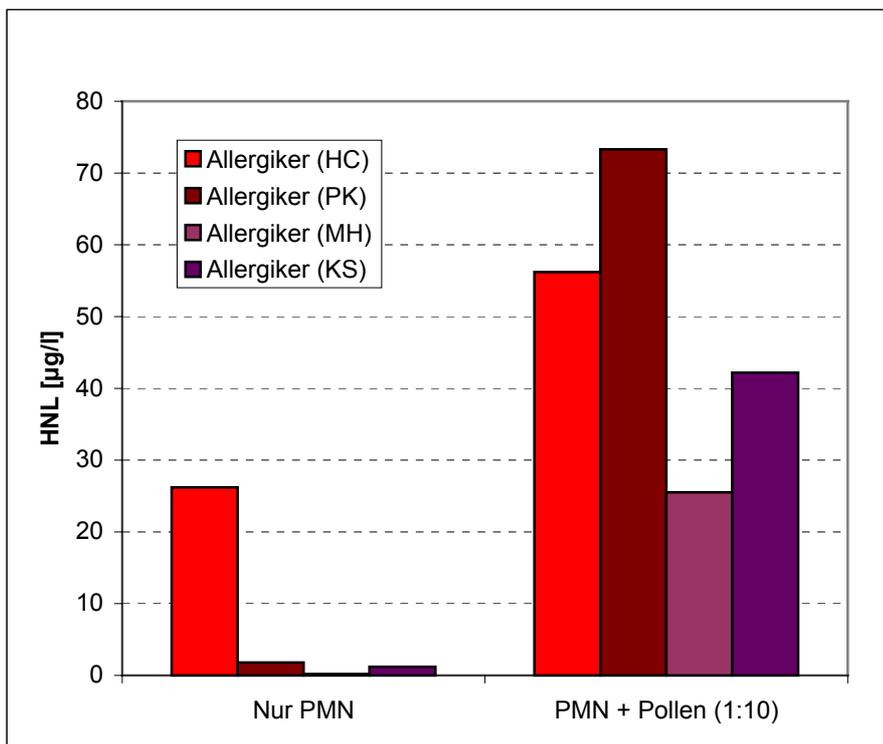


Abbildung 4.1.2-2 Freisetzung von Humanem Neutrophilen Lipokalin (HNL) aus neutrophilen Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) von Birkenpollen-Allergikern mit und ohne Inkubation mit Birkenpollen ($1 \times 10^5/\text{ml}$). Inkubationszeit zwei Stunden im Schüttelwasserbad bei 37°C , pH 7,4 (n=5).

4.1.2.2 Messung von chemotaktischen Faktoren (IL-8 und LTB₄) und immunmodulatorischen Substanzen (PGE₂) im Überstand von Pollen-stimulierten PMN

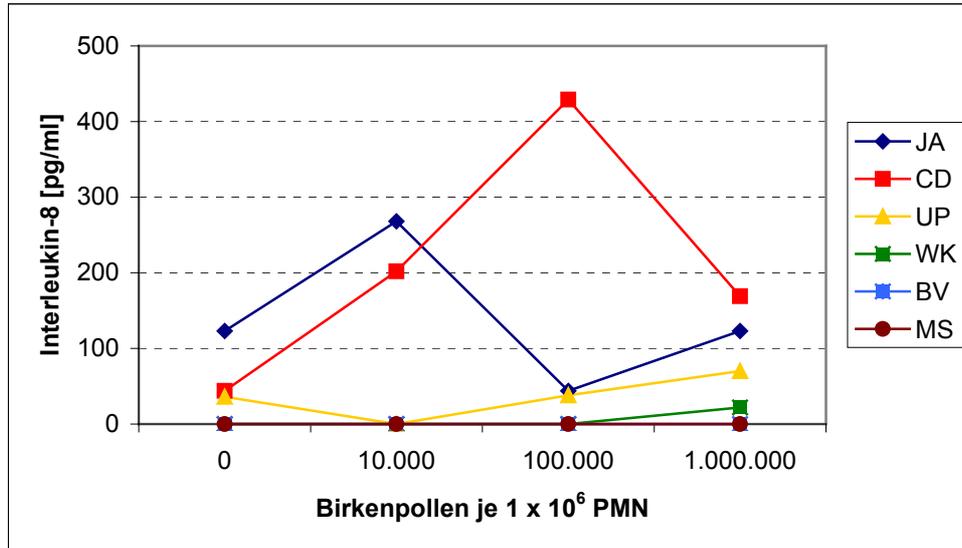
Interleukin-8 (IL-8)

Mit der Fragestellung, ob die Wechselwirkung zwischen Pollen und PMN, insbesondere die Ausbildung führender Lamellen, als Ausdruck der Zell-Mobilität, auf die Wirkung chemotaktischer Faktoren zurückzuführen ist, die autokrin aus PMN freigesetzt werden können, wurde Interleukin-8 im Überstand von mit Birkenpollen stimulierten neutrophilen Granulozyten mittels ELISA bestimmt.

Probenansätzen mit 1×10^6 PMN/ml wurden Birkenpollen im Verhältnis 1:100 (1×10^4 Pollen/ml), 1:10 (1×10^5 Pollen/ml) und 1:1 (1×10^6 Pollen/ml) zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug zwei und fünf Stunden. Es wurden sechs Allergiker und sieben Nicht-Allergiker getestet (Doppelansätze je Probe). Im Ergebnis zeigte sich, daß 2-stündige Inkubationszeit bei Nicht-Allergikern keine nennenswerte Interleukin-8-Produktion induzierte (*Abb. 4.1.2-3B*), jedoch zwei von sechs Allergikern (B. V., C. D.) eine IL-8-Freisetzung von über 250 pg/ml (*Abbildung 4.1.2-3A*) zeigten. Nach fünf Stunden Inkubationszeit war bei einer Pollenkonzentration von 1×10^5 /ml sowohl bei Allergikern wie auch Nicht-Allergikern die höchste IL-8-Freisetzung zu messen (*Abbildung 4.1.2-4 A und B*). Dabei lagen die Werte bei Allergikern zwischen 0 und 738 pg/ml IL-8. Die Zellen eines Allergikers (B. V.) zeigten keine Response. Die Werte von Nicht-Allergikern betragen 0 bis 360 pg/ml IL-8.

Bei der statistischen Auswertung wurde die IL-8-Freisetzung aus PMN von Birkenpollen-Allergikern bei Stimulierung mit den verschiedenen Pollenkonzentrationen mit der IL-8-Freisetzung aus PMN von Nicht-Allergikern bei den verschiedenen Pollenkonzentrationen verglichen. Ein Vergleich dieser beiden unabhängigen Stichproben mittels Mann-Whitney-Wilcoxon-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied in der IL-8-Sekretion aus PMN von Birkenpollen-Allergikern und Nicht-Allergikern ($p=0,32$).

A Birkenpollen-Allergiker



B Kontrollpersonen

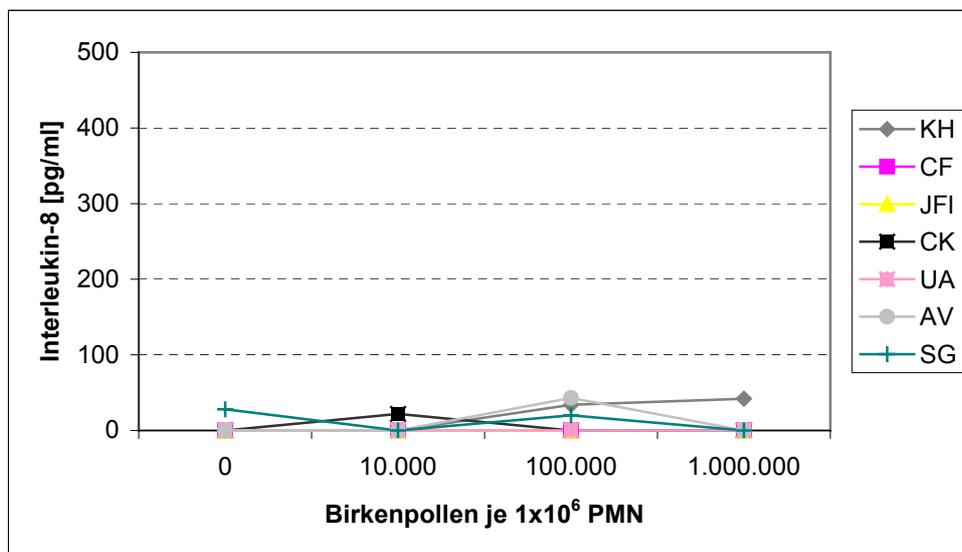
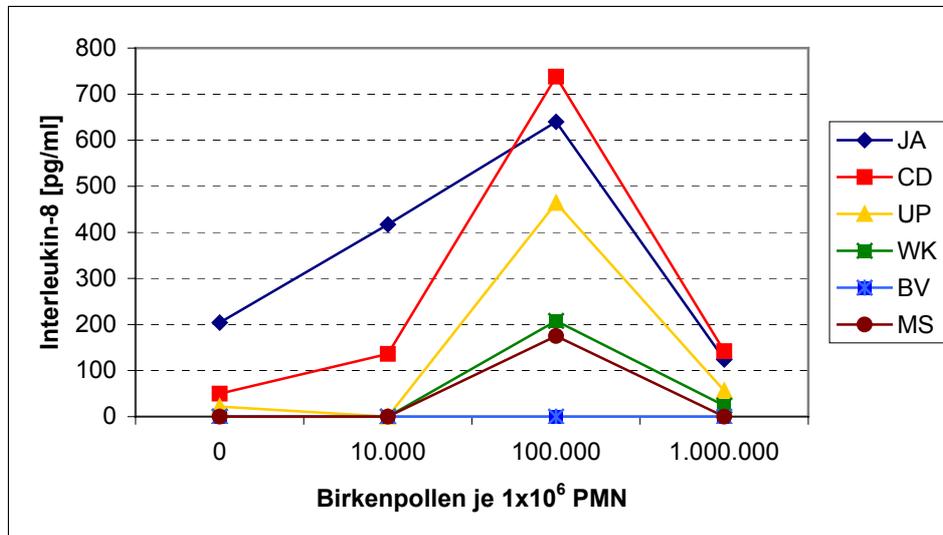


Abbildung 4.1.2-3 Messung von Interleukin-8 im Überstand von PMN-Pollen-Suspensionen nach einer Inkubationszeit von **120 Minuten** in Abhängigkeit von der Pollenkonzentration bei Birkenpollen-Allergikern (**A**) und bei Nicht-Allergikern (**B**). Es sind Mittelwerte von zwei Bestimmungen, je Versuchsansatz und je Proband angegeben.

A Birkenpollen-Allergiker



B Kontrollpersonen

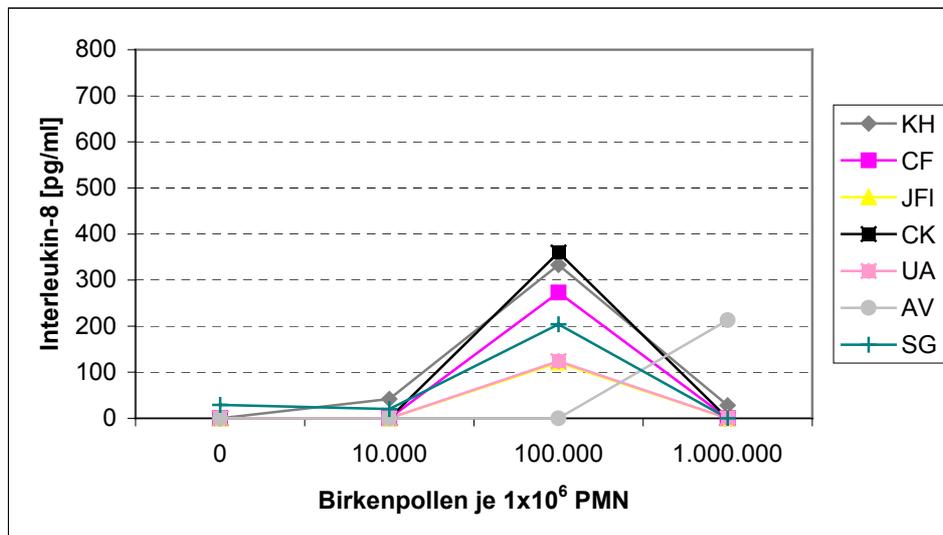


Abbildung 4.1.2-4 Messung von Interleukin-8 im Überstand von PMN-Pollen-Suspensionen nach einer Inkubationszeit von **300 Minuten** in Abhängigkeit von der Pollenkonzentration bei Birkenpollen-Allergikern (A) und Nicht-Allergikern (B). Es sind Mittelwerte von zwei Bestimmungen, je Versuchsansatz und je Proband angegeben.

Messung von LTB₄ und PGE₂ im Überstand der PMN-Pollen-Suspensionen

Neben Interleukin-8 wurde auch Leukotrien B₄ als potentes Chemoattraktans für PMN im Überstand nach zwei Stunden Inkubationszeit gemessen. Während im Überstand der PMN ohne Zugabe von Pollen LTB₄ nur geringfügig nachweisbar war, wurde in PMN-Pollen-Suspensionen bei Einsatz von 1x10⁶ PMN und 1x10⁶ Pollen eine Freisetzung von 140 pg LTB₄/ml gemessen. Eine Dosisabhängigkeit war jedoch nicht erkennbar (*Abbildung 4.1.2-5*).

Auch Ansätze, die zunächst als Kontrollen nur mit 1x10⁶ Birkenpollen, ohne Zusatz von PMN, gefahren wurden, zeigten überraschenderweise ebenfalls positive Werte im LTB₄-ELISA. Diese Werte waren jedoch starken Schwankungen unterlegen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob es sich dabei um Artefakte des ELISA-Tests handelte, die damit irrelevant wären oder ob Pollen selber LTB₄-ähnliche Stoffe freisetzen, die mit dem LTB₄-ELISA kreuzreagieren.

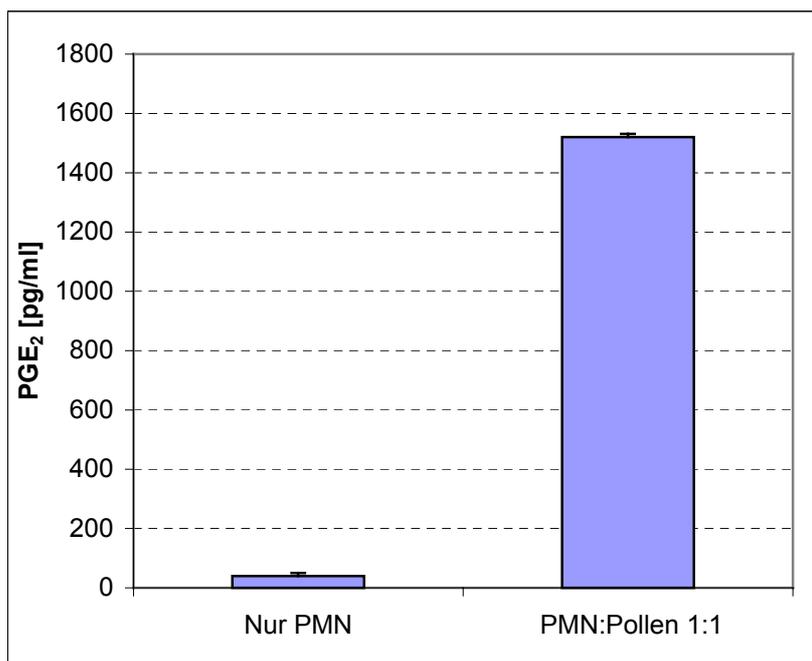
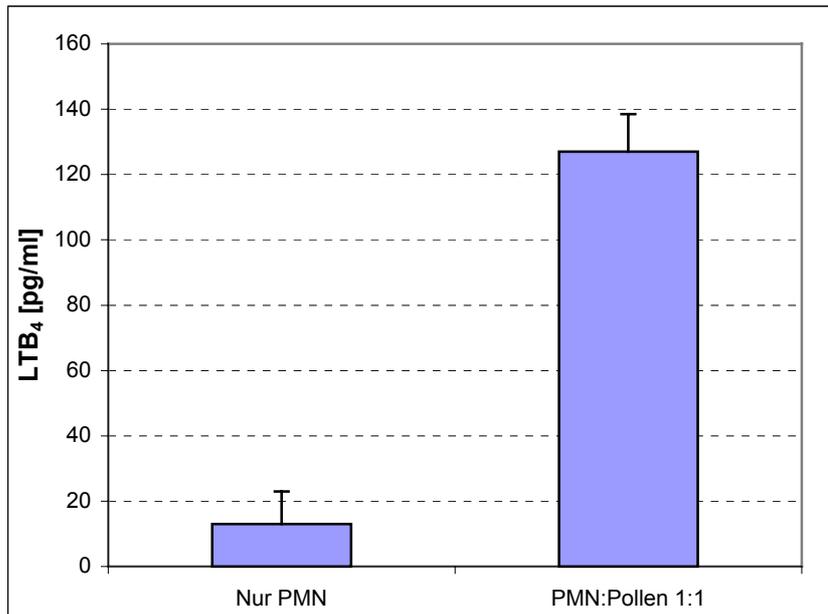


Abbildung 4.1.2-5 Messung von LTB₄ und PGE₂ in Überständen aus neutrophilen Granulozyten (1×10^6 /ml) ohne Pollen und inkubiert mit Birkenpollen (1×10^6 Pollen/ml). Inkubationszeit 120 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad. Angeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3).

4.2 Freisetzung von Polleninhaltsstoffen aus Birkenpollen *in vitro*

4.2.1 Gesamtprotein und Majorallergen Bet v 1: Kinetik, pH- und Temperaturabhängigkeit

Um die Bioverfügbarkeit von Gesamtprotein und dem Majorallergen der Birke Bet v 1 quantitativ zu erfassen, wurden definierte Mengen von Pollen in Suspension gebracht und bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Zur Überprüfung der Freisetzungskinetik von Gesamtprotein und Bet v 1 wurden die Birkenpollen für 0, 1, 5, 10, 30, 120 und 300 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand auf sein Gehalt an Protein und Bet v 1 untersucht. Die Freisetzung der gemessenen Substanzen war unabhängig vom eingesetzten Puffer.

Die gemessene Gesamtprotein-Konzentration im Überstand der Pollensuspension nach 10-minütiger Inkubationszeit entsprach etwa 70% des Maximalwertes ($25,66 \pm 2,29 \mu\text{g}$ Gesamtprotein/ml verglichen mit $36,19 \pm 2,64 \mu\text{g}$ Gesamtprotein/ml; *Abb. 4.2.1-1*). Nach zwei Stunden hatte die Gesamtprotein-Freisetzung das Plateau erreicht, danach erfolgte keine nennenswerte Freisetzung mehr (zwei Stunden: $35,61 \pm 1,60 \mu\text{g/ml}$ vs. fünf Stunden $36,19 \pm 2,64 \mu\text{g/ml}$; *Abb. 4.2.1-1*).

Die Freisetzungskinetik von Bet v 1 verläuft ähnlich wie diejenige des Gesamtproteins, jedoch nicht so steil. Nach 10 Minuten sind erst ein Drittel des Bet v 1 Gehaltes freigesetzt, das Maximum wird nach 2 Stunden erreicht (vgl. *Abb. 4.2.1-2*).

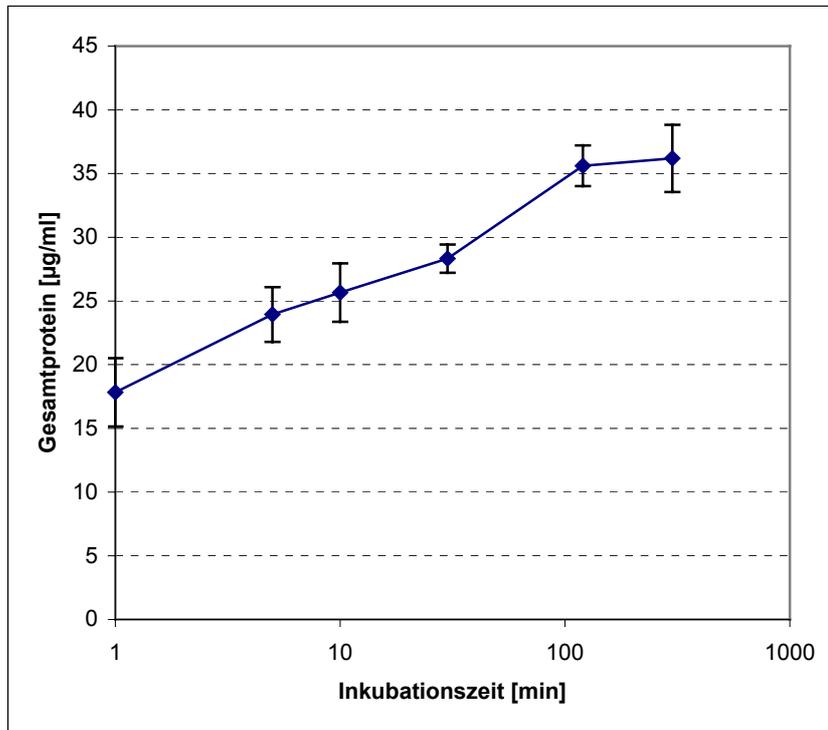


Abb. 4.2.1-1 Kinetik der Gesamtprotein-Freisetzung aus Birkenpollen bei 0, 1, 5, 10, 30, 120 und 300 Minuten Inkubationszeit. Inkubiert wurden 1×10^6 Birkenpollen/ml RPMI 1640 (=6,25 mg Pollen) bei 37°C . Der pH-Wert betrug konstant 7,4. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung und 4-fach-Ansätze mit Doppelbestimmung (n=8).

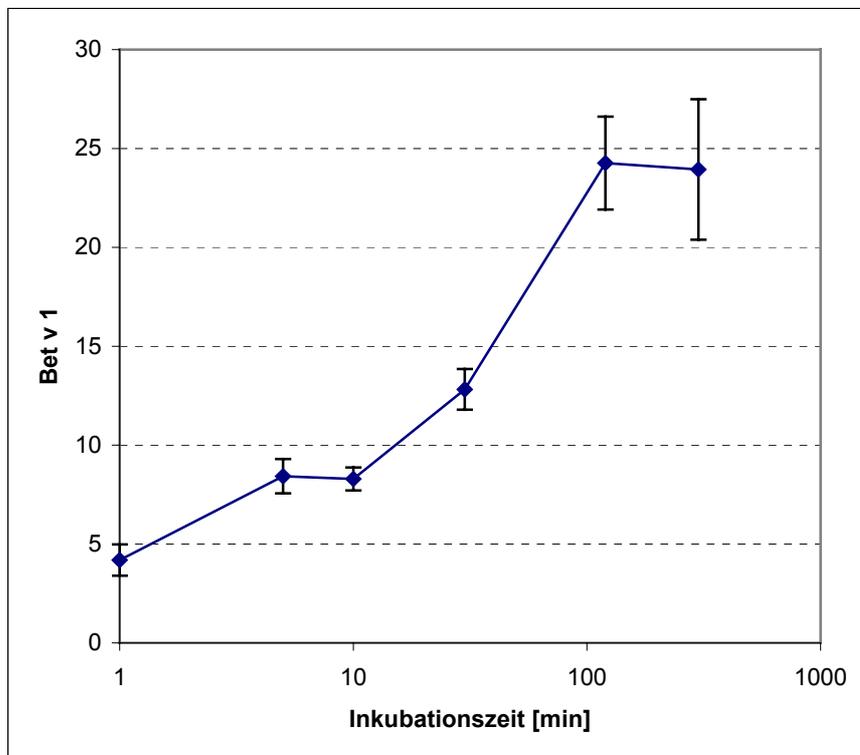


Abb. 4.2.1-2 Kinetik der Bet v 1-Freisetzung aus Birkenpollen bei 0, 1, 5, 10, 30, 120 und 300 Minuten Inkubationszeit. Inkubiert wurden 10 mg Birkenpollen/ml RPMI 1640 bei 37°C. Der pH-Wert betrug konstant 7,4. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung bei 4-fach-Ansätzen (n=4).

Unter der Fragestellung, inwiefern durch Änderung des pH-Wertes die Gesamtmenge freigesetzten Proteins bzw. Bet v 1 aus Birkenpollen beeinflusst wird, wurden die Pollen bei pH 6.0, pH 7.4 und pH 9.0 bei 37°C für 30 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 4.2.1-3* zusammengefaßt. Der höchste Wert Gesamtprotein wurde bei pH 9.0 bestimmt; die Bet v 1-Ausbeute war bei pH 7,4 am höchsten ($11,0 \pm 0,3$; *Tabelle 4.2.1-3*).

Tabelle 4.2.1-3 Freisetzung von Gesamtprotein und Bet v 1 aus Birkenpollen (10 mg Pollen/ml, 37°C, 30 Minuten) in Abhängigkeit von pH-Wert und Medium, n=4

pH	Gesamtprotein [$\mu\text{g/ml}$]		Bet v 1 [$\mu\text{g/ml}$]	
	PBS	RPMI	PBS	RPMI
6,0	$21,6 \pm 0,5$	$28,3 \pm 3,0$	$6,2 \pm 0,7$	$10,9 \pm 1,0$
7,4	$30,0 \pm 2,8$	$34,3 \pm 1,3$	$9,3 \pm 0,9$	$11,0 \pm 0,3$
9,0	$32,6 \pm 1,4$	$35,0 \pm 0,8$	$8,7 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,5$

Auch die Temperatur hat einen Einfluß auf die Menge freigesetzten Proteins bzw. Bet v 1. Extrakte aus Pollen, die bei 4°C, 20°C und 37°C inkubiert worden waren, zeigten eine temperaturabhängige Steigerung des Gesamtproteins als auch des Bet v 1-Gehaltes (*Abb. 4.2.1-3*).

Die Konzentration an Gesamtprotein war bei 4°C am niedrigsten ($12,5 \pm 0,92$ µg/ml; *Abb. 4.2.1-3*) und bei 37°C am höchsten ($22,8 \pm 1,28$ µg/ml; *Abb. 4.2.1-3*). Das Majorallergen der Birkenpollen Bet v 1 wurde bei 4°C mit der niedrigsten ($1,64 \pm 0,22$ µg/ml) und bei 37°C mit der höchsten ($10,43 \pm 1,25$ µg/ml) Konzentration gemessen (*Abb. 4.2.1-3*).

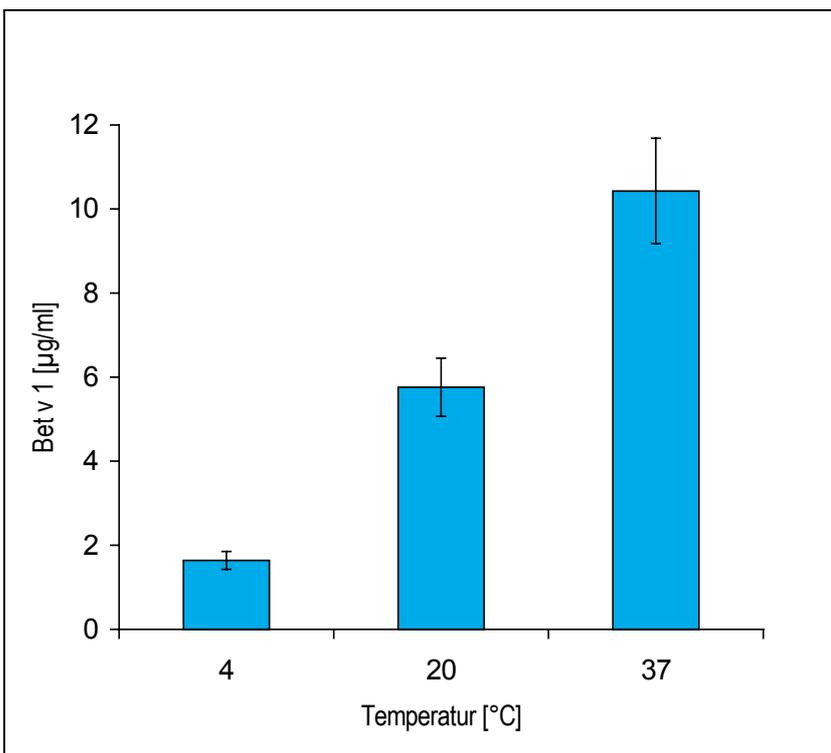
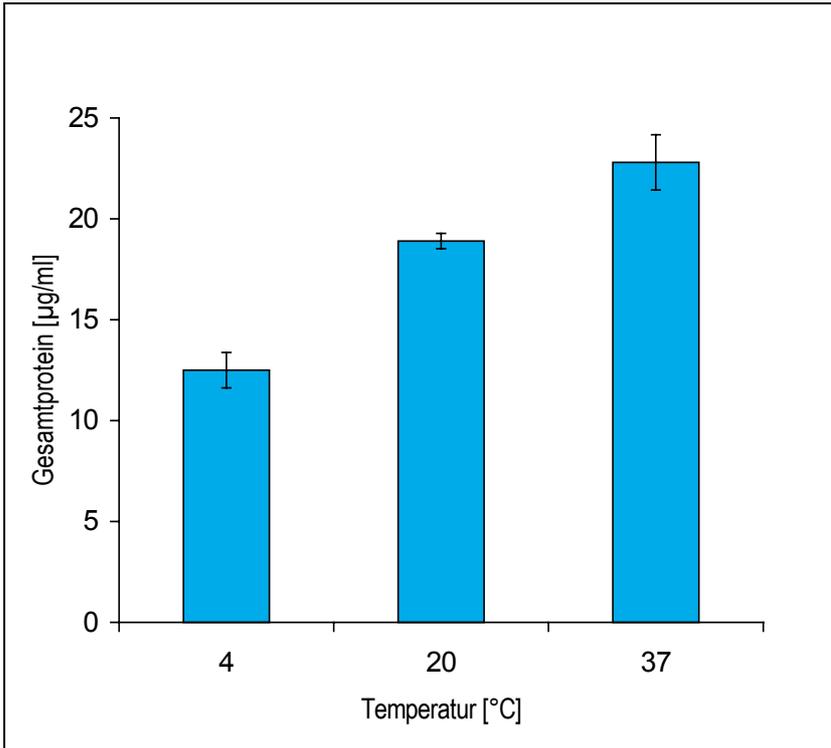


Abb. 4.2.1-3 Freisetzung von Gesamtprotein und Bet v 1 aus *Betula alba* bei 4°C, 20°C und 37°C. Inkubiert wurden 6,25 mg Pollen (=1x10⁶ Pollen/ml RPMI 1640) bei pH 7,4 für 30 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4).

4.2.2 Freisetzung von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen

Leukotrien B₄ (LTB₄), Leukotrien C₄/D₄/E₄ (LTC₄/D₄/E₄) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) sind Derivate der Arachidonsäure, die in höheren Pflanzen jedoch nicht vorhanden sind. Aufgrund der nachgewiesenen Kreuzreaktivität wird deshalb im Folgenden von LTB₄-, LTC₄/D₄/E₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen gesprochen. Die Entdeckung, daß in wäßrigen Pollenüberständen LTB₄-ähnliche, mit dem LTB₄-ELISA kreuzreagierende Aktivität nachgewiesen werden konnte (*Abb. 4.1.2-2*), gab Veranlassung, diesem Phänomen näher nachzugehen. Im Folgenden wird die Konzentration von LTB₄-ähnlichen Substanzen in Pollenüberständen in Abhängigkeit Inkubationszeit, eingesetzter Pollenzahl, pH-Wert und Temperatur in zwei verschiedenen Puffern gemessen.

Kinetik

Um zu untersuchen, welchen Zeitverlauf die Freisetzung hat, wurden die Pollen in Medium (RPMI 1640) bzw. Phosphatpuffer (PBS) über 1, 5, 10, 30, 120 und 300 Minuten (37°C, pH 7,4) suspendiert, anschließend zentrifugiert und dann gemessen. Es wurde auch getestet, ob die in Pollenüberständen vorhandenen Substanzen weitere Kreuzreaktivitäten aufwiesen, so z. B. zu LTC₄/D₄/E₄ (s. u.) und zu PGE₂. Alle genannten Lipidmediatoren (LTB₄, LTC₄/D₄/E₄, PGE₂) wurden in Pollenüberständen mittels kommerzieller ELISA-Techniken nachgewiesen (*Abb. 4.2.2-1 bis 4.2.2-6*).

Bei den Eicosanoid-ähnlichen Substanzen LTB₄ und PGE₂ war die maximale Freisetzung bereits nach 30-minütiger Inkubationszeit erreicht, während schon nach 1-minütiger Inkubationszeit 60% des gesamten LTB₄ bioverfügbar war. Damit erfolgt sie zeitlich vor dem Allergenrelease (*Abb. 4.2.1-2*). Die Freisetzung an LTB₄-ähnlicher Substanzen betrug nach 30-minütiger Inkubationszeit 316 ± 37 pg/ml und nach 300 Minuten 370 ± 24, ein ähnlicher Verlauf wurde bei PGE₂-ähnlicher Substanzen zu vermerken: 30 Minuten Inkubationszeit entsprach einer Freisetzung von 1840 pg PGE/ml im Vergleich zu 1914 ± 122 nach 300-minütiger Inkubation (s. *Abbildung 4.2.2-1*)

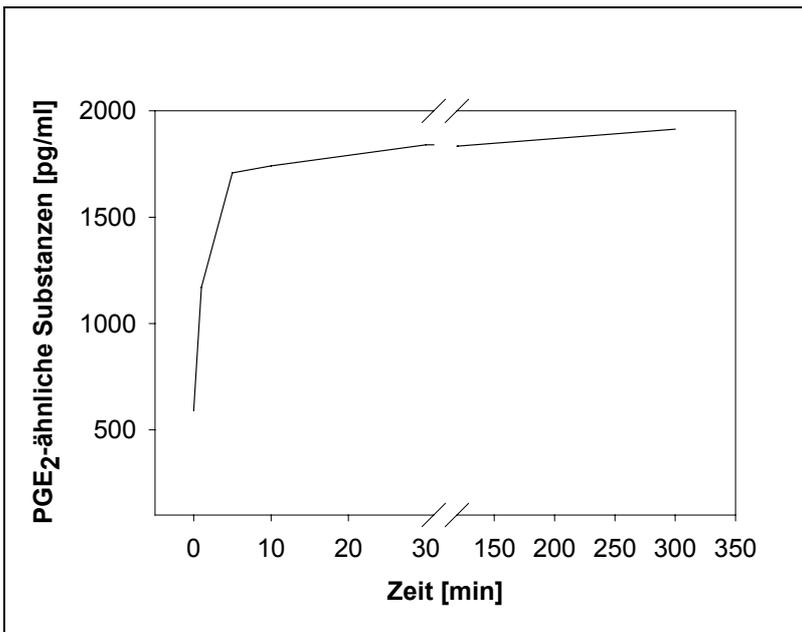
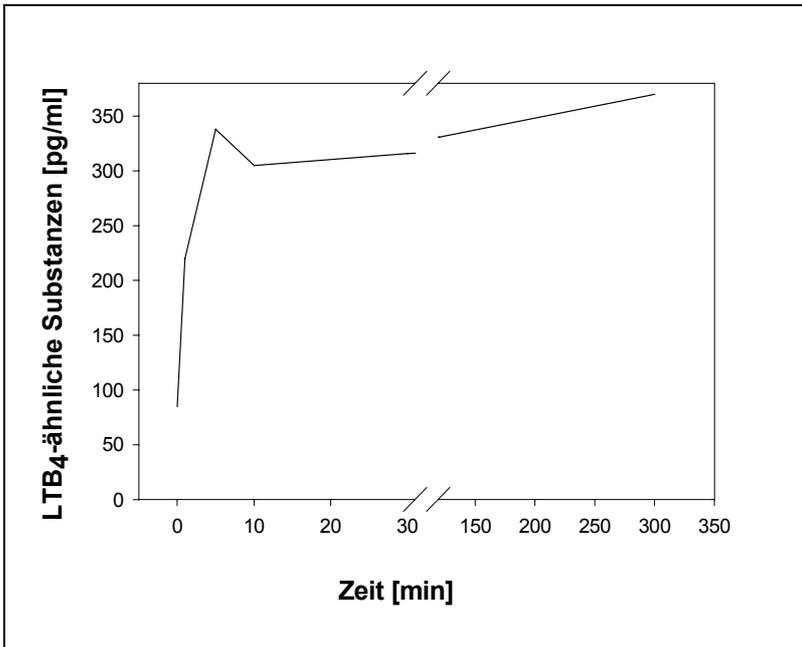


Abb. 4.2.2-1 Kinetik der Freisetzung von LTB₄-ähnlicher und PGE₂-ähnlicher Substanzen aus Birkenpollen bei einer Inkubationszeit von 0, 1, 5, 10, 30, 120 und 300 Minuten. Inkubiert wurden 1×10^6 Birkenpollen/ml RPMI 1640 bei 37°C, pH 7,4. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=8).

Um die Dosisabhängigkeit der Freisetzung der Eicosanoid-ähnlichen Substanzen (LTB₄- und PGE₂-ähnliche Substanzen) aus Birkenpollen zu überprüfen, wurden 0, 1x10⁴, 2x10⁴, 1x10⁵, 2x10⁵, 1x10⁶ und 2x10⁶ Pollen/ml RPMI bei 37°C, pH 7,4, im Schüttelwasserbad inkubiert und nach 30-minütiger Inkubationszeit die Konzentration an LTB₄-ähnlicher Substanz und PGE₂-ähnlicher Substanz im pollenfreien Überstand gemessen. *Tabelle 4.2.2-1* zeigt die eindeutige Konzentrationsabhängigkeit: Wurde bei 200.000 Pollen/ml 23 ± 7 pg LTB₄/ml freigesetzt, so verfünffachte sich der LTB₄-Gehalt bei fünffacher Konzentration (1.000.000 Pollen/ml) ebenfalls (100 ± 40 pg LTB₄/ml). Bei der PGE₂-Freisetzung war ein ähnliches Ergebnis zu sehen: Bei 100.000 Pollen/ml wurde 68 ± 50 pg PGE₂/ml gemessen, bei der doppelten Anzahl Pollen (200.000 Pollen/ml) wurde das 1,8-fache an PGE₂ gemessen (125 ± 96 pg PGE₂/ml).

Tabelle 4.2.2-1: Wirkung der Pollenzahl auf die Freisetzung von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen

Pollen- zahl	0	1x10 ⁴	2x10 ⁴	1x10 ⁵	2x10 ⁵	1x10 ⁶	2x10 ⁶
LTB ₄ - ähnliche Substanzen	0	0	0	15±9	23±7	100±40	248±54
PGE ₂ - ähnliche Substanzen	23±20	20±26	25±32	68±50	125±96	865±363	1678±509

Zur Überprüfung der pH-Abhängigkeit der Freisetzung von den Eicosanoid-ähnlichen Substanzen (LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen) wurden bei Variierung des pH-Wertes und 30-minütiger Inkubation im Überstand der Pollensuspension Messungen vorgenommen. Da die in Pflanzen aktiven Lipoxygenasen LOX-1 und LOX-2 höchste Aktivität bei pH 7.4 und pH 9.0 aufweisen, wurden die Pollen bei pH 6.0, 7.4 und 9.0 inkubiert. Die Freisetzung der Eicosanoid-ähnlichen Substanzen ist pH-abhängig, sowohl bei Suspension in RPMI 1640 (Medium) als auch bei Verwendung von PBS als Puffer (*Abb. 4.2.2-2 und Abb. 4.2.2-3*). Die höchsten Werte von LTB₄- und PGE₂-ähnlicher Substanz wurde bei pH 9.0 (LTB₄ 400 ± 29 pg/ml bzw. PGE₂ 2802 ± 103 pg/ml), die niedrigsten bei pH 6.0 (LTB₄ 140 ± 6 pg/ml bzw. PGE₂ 1207 ± 83 pg/ml) gemessen (*Abbildung 4.2.2-2 und Abb. 4.2.2-3*).

In demselben Ansatz wurde auch geprüft, ob LTC₄/D₄/E₄-ähnliche Substanzen ebenfalls nachweisbar sind und der pH-Abhängigkeit folgen. Die gemessene Konzentration an LTC₄/LTD₄/LTE₄ im Überstand der Pollensuspension war bei pH 9.0 am höchsten (121 ± 15 pg/ml) und bei pH 6.0 am niedrigsten (63 ± 8 pg/ml; *Abbildung 4.2.2-4*), insgesamt jedoch gering.

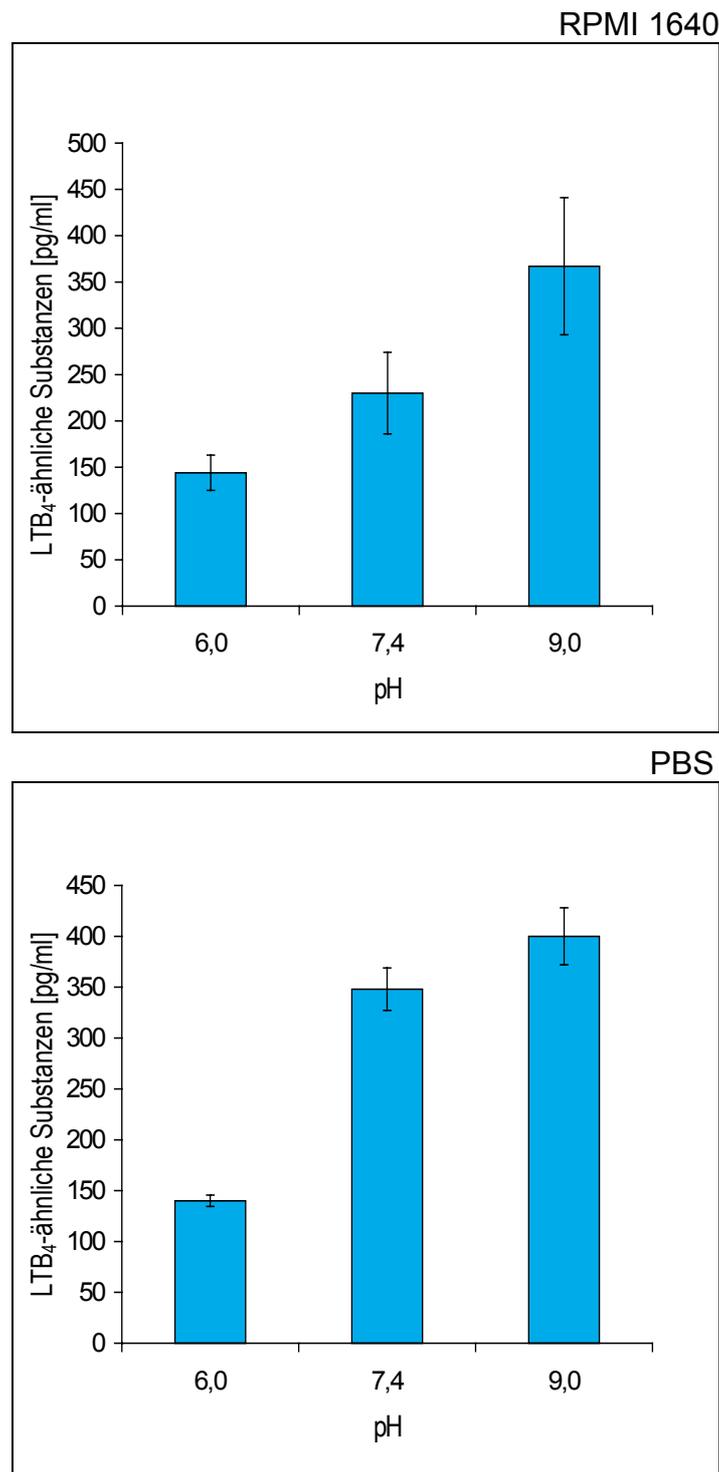


Abb. 4.2.2-2 Freisetzung von LTB₄-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen bei pH 6,0/7,4/9,0. Inkubiert wurden 10 mg Pollen/ml mit RPMI (obere Graphik; n=8) bzw. PBS (untere Graphik; n=4) bei 37°C für 30 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

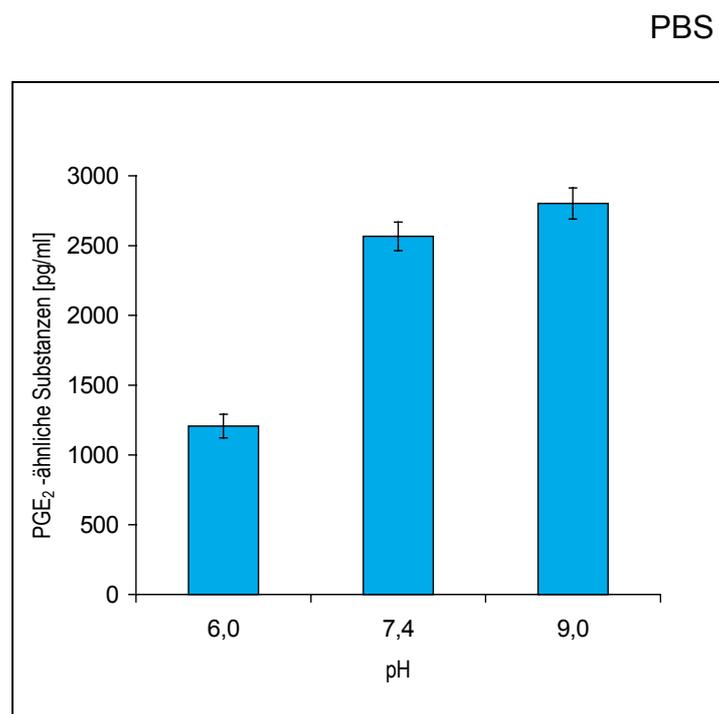
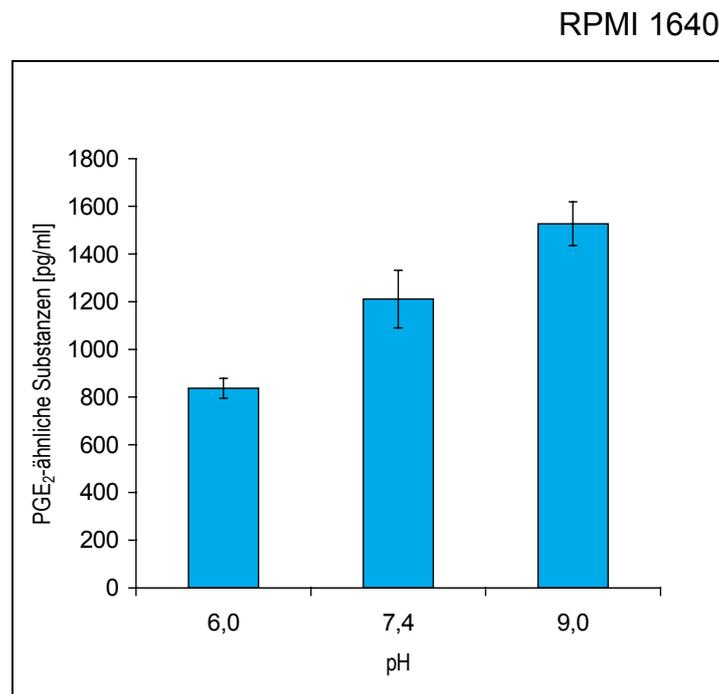


Abb. 4.2.2-3 Freisetzung von PGE₂-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen bei pH 6,0 / 7,4 / 9,0. Inkubiert wurden 10 mg Pollen/ml mit RPMI (obere Graphik; n=8) bzw. PBS (untere Graphik, n=4) bei 37°C für 30 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung.

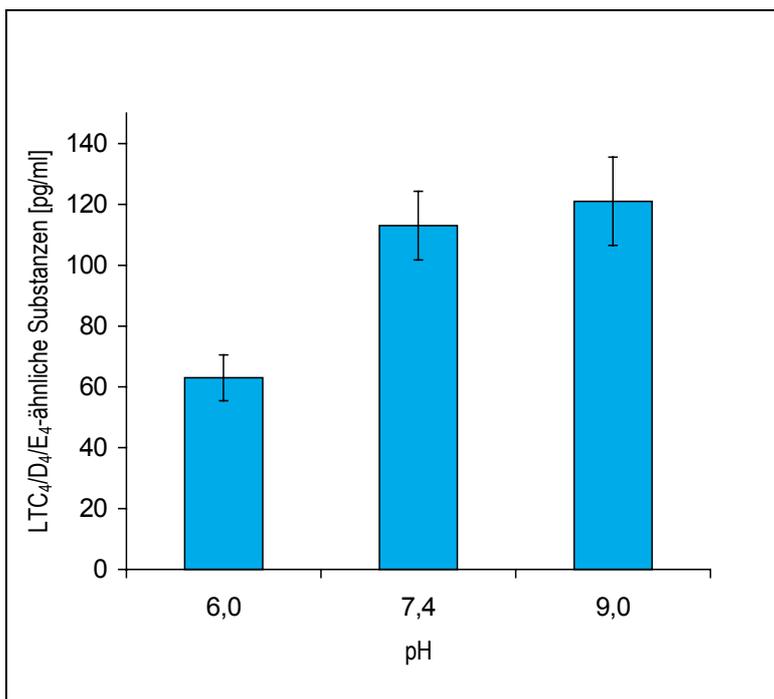


Abb. 4.2.2-4 Freisetzung von LTC₄/D₄/E₄-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen bei pH 6,0 / 7,4 / 9,0. Inkubiert wurden 10 mg Birkenpollen/ml PBS bei 37°C für 30 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=4).

Temperaturabhängigkeit

Unter der Fragestellung, ob die Temperatur einen Einfluß auf die Freisetzung von LTB₄-ähnlichen und PGE₂-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen hat, wurden die Versuche mit Pollen bei 4°C, 20°C und 37°C durchgeführt. Wie die *Abb. 4.2.2-5* zeigt, ist die Freisetzung von LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen bei 37°C am höchsten.

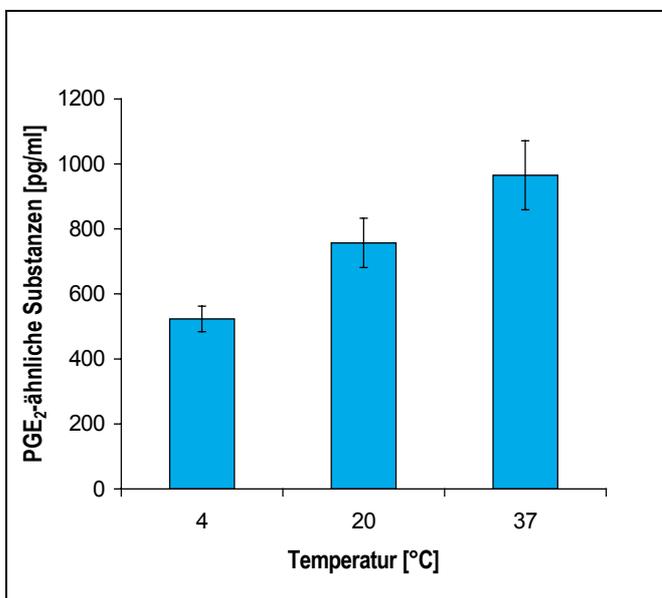
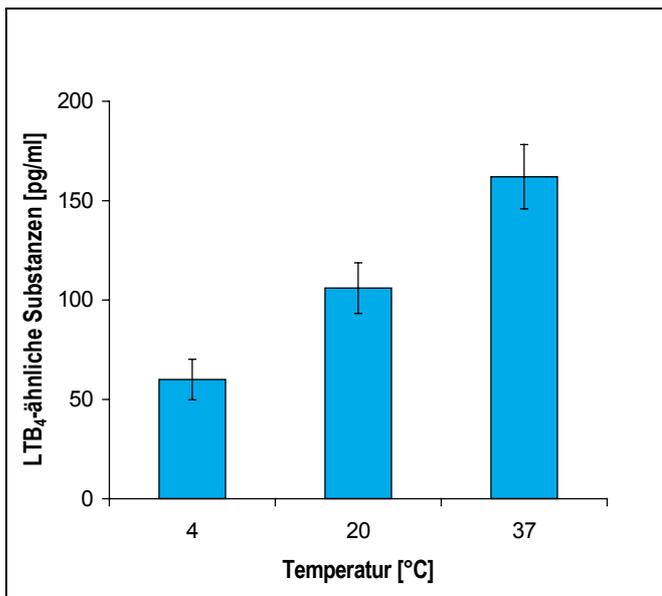


Abb. 4.2.2-5 Freisetzung von LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen bei 4°C, 20°C und 37°C. Inkubiert wurden 1 x 10⁶ Pollen/ml RPMI 1640 (=6,25 mg) bei pH 7,4 für 30 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=8).

Einfluß von Pollenalterung

Es wurde weiter geprüft, ob die Konzentrationen von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen im Pollenextrakt vom Alter der eingesetzten Pollen abhängig ist. Dazu wurden die Konzentrationen LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen zweimal gemessen und miteinander verglichen.

Im März 1998 wurde z. B. im Überstand der Birkenpollensuspension eine Konzentration von 229 ± 46 pg LTB₄/ml gemessen (pH 9,0, 37°C, 30 Minuten Inkubationszeit). Im August desselben Jahres war die Konzentration mit 400 ± 29 pg LTB₄/ml (pH 9,0, 37°C, 30 Minuten) fast doppelt so hoch (*Abbildung 4.2.2-6*). Ähnliches gilt für PGE₂-ähnliche Substanzen: Die Konzentration hatte sich in den angegebenen sechs Monaten sogar verdreifacht: Anstieg von 954 ± 53 pg/ml im März auf 2802 ± 103 pg/ml im August (*Abbildung 4.2.2-6*). Je älter die Pollen werden, um so größer ist demnach die Freisetzung an LTB₄- beziehungsweise PGE₂-ähnliche Substanzen.

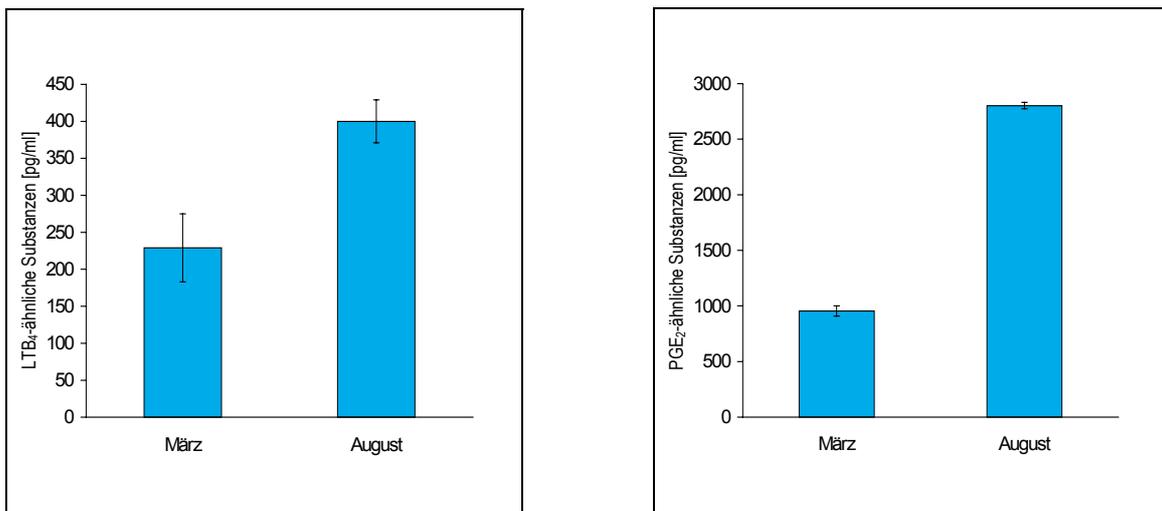


Abb. 4.2.2-6 Freisetzung von LTB₄-und PGE₂-ähnlicher Substanz im März und August 1998. Inkubiert wurden 1×10^6 Pollen/ml RPMI 1640 (=6,25 mg) bei pH 9,0 für 30 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=8).

4.2.3 Freisetzung von LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen aus Birken, Lieschgras-, Beifuß- und Kieferpollen im Vergleich

Zur Überprüfung der Freisetzung von LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen aus verschiedenen Pollenarten wurden Suspensionen mit Birkenpollen (*Betula alba* L.), Lieschgraspollen (*Phleum pratense* L.), Beifußpollen (*Artemisia vulgaris* L.) und Kieferpollen (*Pinus sylvestris* L.) angefertigt und Überstände im LTB₄- bzw. PGE₂-ELISA eingesetzt. Im Ergebnis zeigte sich, daß alle untersuchten Pollenarten LTB₄-ähnliche und PGE₂-ähnliche Substanzen freisetzen, wenn auch in unterschiedlichem Maße.

Die höchste Freisetzung von PGE₂-ähnlichen Substanzen aus Pollen fand sich bei Birken (2599 ± 93 pg/ml) und bei Beifußpollen (2514 ± 232 pg/ml), die niedrigste bei Lieschgraspollen (696 ± 15 pg/ml) und Kieferpollen (625 ± 59 pg/ml; *Abb. 4.2.3-1*). LTB₄-ähnliche Substanzen wurden nur in den Überständen von Birken- (348 ± 19 pg/ml), Lieschgras- (391 ± 19 pg/ml) und Beifußpollen (312 ± 28 pg/ml) gemessen, aus Kieferpollen wurde fast kein LTB₄ freigesetzt (30 ± 1 pg/ml; *Abb. 4.2.3-1*). Die Befunde lassen vermuten, daß allergene Pollen über ein Allergen-unabhängiges proinflammatorisches Prinzip verfügen.

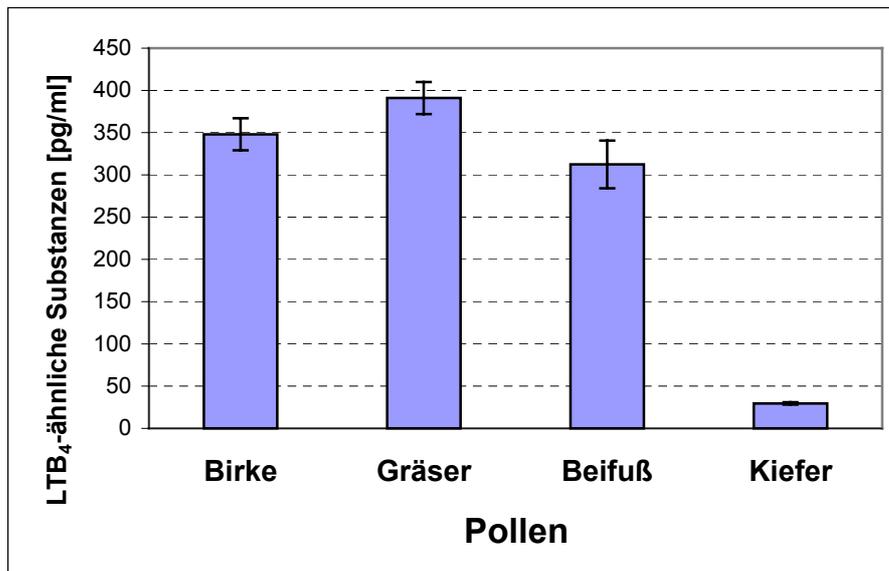
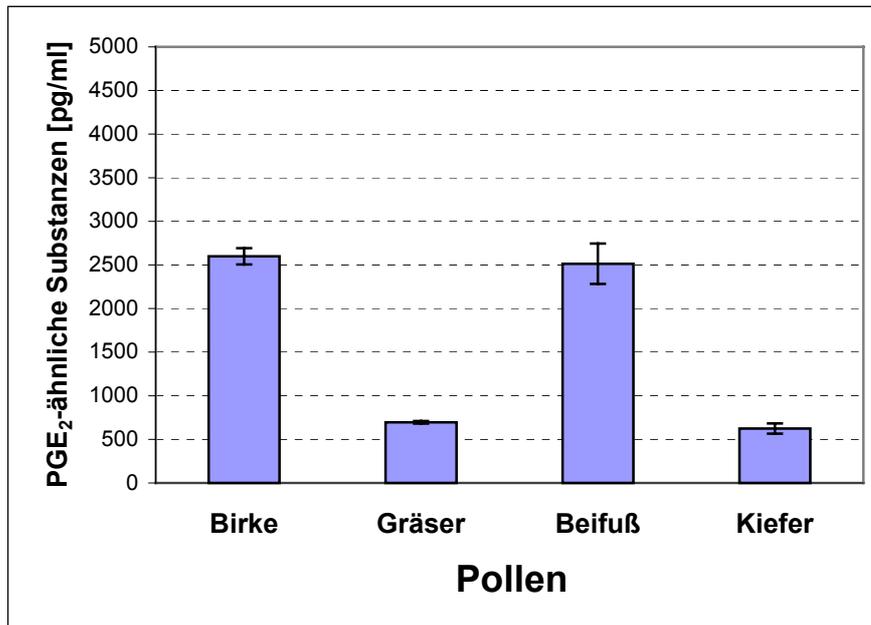


Abb. 4.2.3-1 Freisetzung von PGE₂- und LTB₄-ähnlichen Substanzen aus Birken-, Lieschgras-, Beifuß- und Kieferpollen. Überstände von 10 mg Pollen/ml PBS bei pH 7,4 und 37°C, Inkubationszeit 30 Minuten. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n=8).

4.2.4 Identifizierung und Charakterisierung der Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen mittels HPLC

Höhere Pflanzen besitzen keine Arachidonsäure als Ausgangssubstanz für Leukotriene und Prostaglandine, wohl aber große Mengen an Linol- und Linolensäure, die entweder autooxidativ oder enzymatisch zu monohydroxylierten Derivaten mit LTB₄-ähnlicher Wirkung oder zu Isoprostanen abgebaut werden können. Es wurde deshalb versucht, die lipidlösliche Fraktion von Birkenpollen zu eluieren und mittels HPLC aufzuschließen. Tabelle 4.2.4-1 gibt die quantitativen Daten, *Abb. 4.2.4-1* die entsprechenden HPLC-Peaks an. Kandidaten für die LTB₄-ähnliche Wirkung sind 6- und 13-Hydroxyoctadecadiensäure (HODE) und 9-, 12-, 13- und 16-Hydroxyoctadecatriensäure (HOTE). Das Vorliegen der R- als auch S-Stereoisomere im gleichen Verhältnis läßt eher auf einen autooxidativen als einen enzymatischen Prozeß schließen.

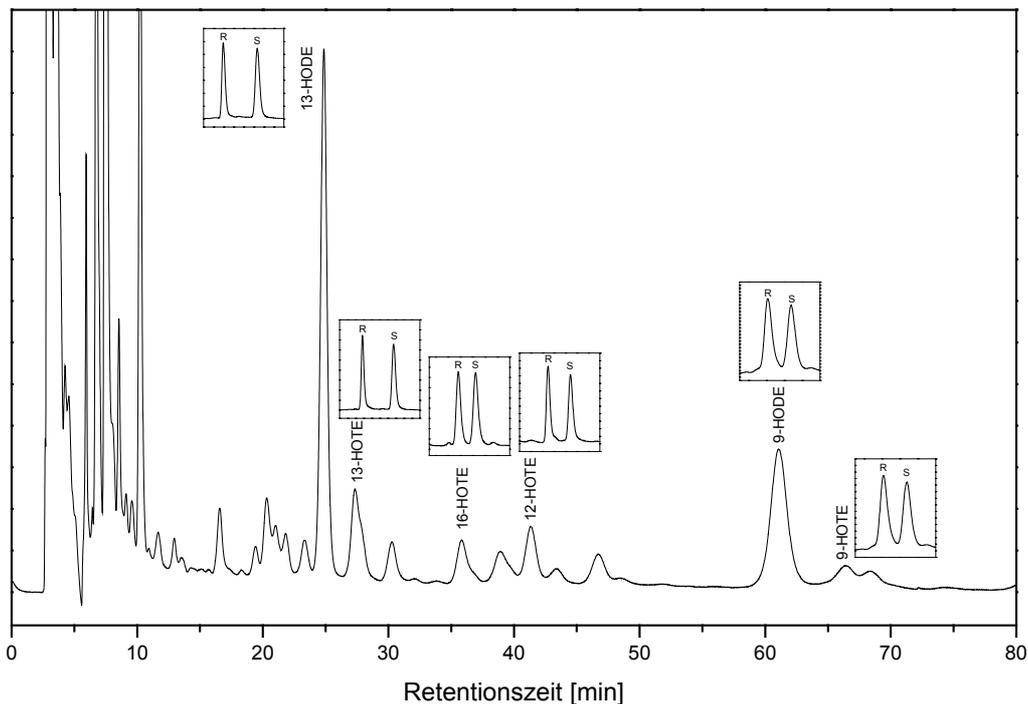


Abbildung 4.2.4-1 Isolierung von 9- und 13-HODE und 9, 12, 13- und 16-HOTE aus Birkenpollen.

Tabelle 4.2.4-1 Quantitative Analyse von Birkenpollen (<i>Betula alba</i>)							
Angaben in nmol/g							
Linolensäure	Linolsäure	13-HODE	13-HOTE	16-HOTE	12-HOTE	9-HODE	9-HOTE
295	288	9,1	1,6	1,0	1,3	6,3	1,0

Nachweis von Lipoxygenase in Birkenpollen

Um nachzuweisen, daß in Birkenpollen Lipoxygenase (LOX) vorhanden ist, die die Synthese von Lipoxygenase-ähnlichen Substanzen oder HODE (Hydroxyoctadecadiensäure) aus Birkenpollen enzymatisch katalysiert, wurde aus Birkenpollen Protein extrahiert und die Lipoxygenase mit einem polyclonalen LOX-Antikörper der Gurke im Westernblot nachgewiesen (s. *Abbildung 4.2.4-2*). Es läßt sich bei Chloroform Extraktion mit Aceton/Ethanol eine Bande nachweisen und bei Extraktion mit Trichloressigsäure erkennt man zwei Banden bei 97 kDa.

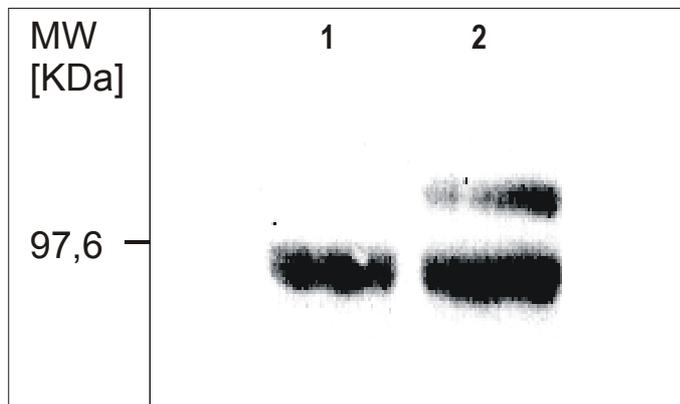


Abbildung 4.2.4-2 Proteinextraktion aus Birkenpollen (*Betula alba* L.) und Westernblot mit einem polyclonalen Lipoxygenase-Antikörper. Überstand der Chloroform-Extraktion mit Aceton/Ethanol (1) und Trichloressigsäure (2).

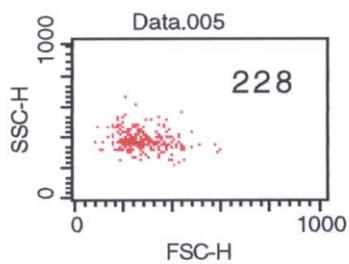
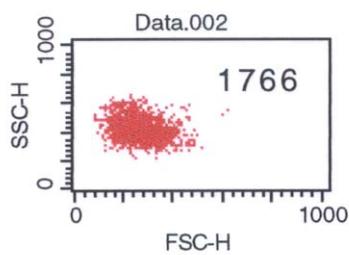
4.2.5 Nachweis der biologischen Relevanz der Eicosanoid-ähnlichen Substanzen

Um chemotaktische Aktivität von Birkenpollen-Inhaltsstoffen zu überprüfen, wurden Migrationsexperimente unter Verwendung von Transwellkammern durchgeführt und die Anzahl der durch eine 5 µm große Membran (Transwell) migrierten neutrophilen Granulozyten mittels FACS (Floureszenz-Activated Cell Sorter) quantifiziert. Im FACS werden verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit differenziert.

Neutrophile Granulozyten (1×10^5) wurden in einen Transwell-Einsatz pipettiert, der durch eine Membran die Zellen von der Birkenpollen-Suspension (Überstand von 3,4 mg Pollen/ml) trennt. Um die migrationsfördernde Wirkung von Birkenpollen-Suspensionen nachzuweisen, wurden die Zellen für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank bei 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Anzahl migrierter Zellen im FACS quantifiziert. Es zeigte sich, daß Birkenpollen-Suspensionen eine ähnlich starke chemotaktische Wirkung besitzen wie das klassische Chemoattraktans Leukotrien B₄ (LTB₄). LTB₄ führte zu einer Chemotaxis von 1766 neutrophilen Granulozyten, im Vergleich zu 1466 migrierten neutrophilen Granulozyten bei Benutzung der Birkenpollen-Suspensionen.

Die chemotaktische Wirkung von LTB₄ bzw. von der Birkenpollen-Suspension konnte durch Vorinkubation der Zellen für 30 Minuten mit dem selektiven Leukotrien B₄-Rezeptor-Antagonisten (LY293111) gehemmt werden: Nur noch 228 bzw. 660 migrierte neutrophile Granulozyten migrierten (s. *Abbildung 4.2.5-1*). Da die gerichtete Chemotaxis von PMN auch die Voraussetzung für die nachfolgende Adhärenz der Zellen an Pollenoberflächen und LTB₄ selbst auch eine Adhärenz hervorruft, führte LY293111 auch zur Hemmung der Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen (67% versus 18%), wie in *Abbildung 4.2.5-2* zu sehen ist.

Leukotrien B₄
($3,9 \times 10^{-10}$ M)



Birkenpollen-Suspension
(3,4 mg/ml)

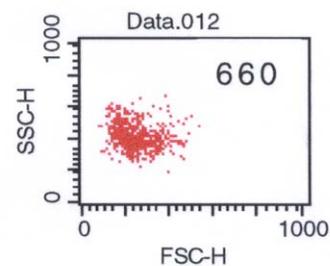
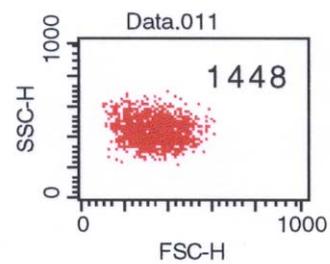


Abbildung 4.2.5-1 Anzahl der migrierten neutrophilen Granulozyten bei Verwendung von LTB₄ ($3,9 \times 10^{-10}$ M) bzw. Birkenpollen-Suspension (3,4 mg/ml) als Chemoattraktans (obere Zeile) und Hemmung der Chemotaxis durch Verwendung eines selektiven LTB₄-Rezeptor-Antagonisten (40 μ M LY293111; untere Zeile).

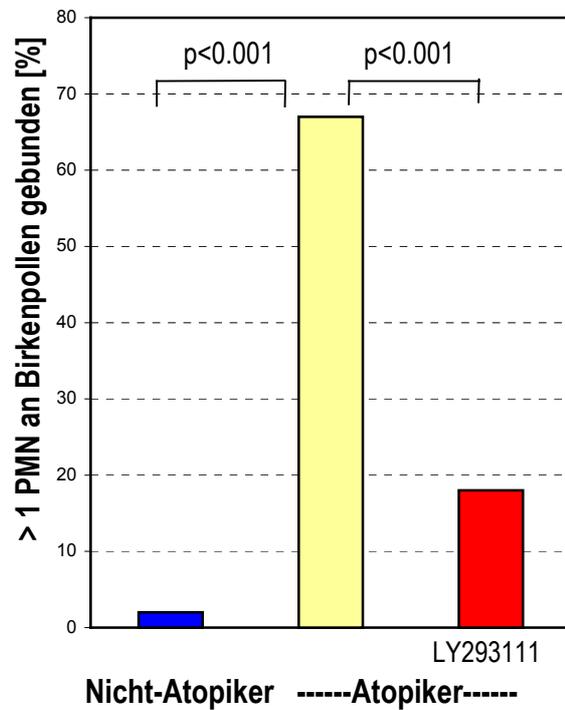


Abbildung 4.2.5-2 Anzahl der neutrophilen Granulozyten, die an Birkenpollen (*Betula alba* L.) binden. Vergleich der PMN von Atopiker und Nicht-Atopiker. 6,25 mg Birkenpollen je 1×10^6 PMN/ml RPMI, 37°C, 30 Minuten. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Birkenpollen mit humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro* interagieren. Diese Wechselwirkung ist sowohl morphologisch als auch funktionell nachweisbar.

Sowohl die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen als auch deren migrationsfördernde Aktivität konnte durch Vorinkubation mit einem selektiven Leukotrien B₄-Rezeptor-Antagonisten (LY293111) gehemmt werden. Bereits 1986 beschrieben MACKAY et al. die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Pollen über einen Transferrin-Rezeptor vermittelt [141]. In dieser Arbeit wird darüberhinaus erstmals gezeigt, daß sich PMN von Allergikern und Nicht-Allergikern unterschiedlich verhalten: Allergiker-PMN besitzen eine verstärkte Tendenz zur Lamellenbildung bei Kontakt mit Birkenpollen *in vitro*. Diese Lamellenbildung kann sowohl auf einer Vorstimulierung der PMN von Allergikern als auch auf Mediatorfreisetzung aus Birkenpollen zurückzuführen sein [34; 35]. Untersuchungen von SUN et al. (2000) haben gezeigt, daß im Pollenschlauch Integrin-ähnliche Proteine lokalisiert sind [223]. Neutrophile Granulozyten könnten somit über Integrine vermittelt an Pollen binden, so wie es bereits bei der Wechselwirkung von Pollen mit Makrophagen beschrieben worden ist [52].

Da PMN, wie kürzlich von GOUNNI et al. beschrieben wurde [91], über einen hochaffinen IgE-Rezeptor verfügen, könnte die Adhärenz auch Ausdruck einer Bindung von Birkenpollen-Allergenen an diesem Rezeptor sein. Da aber aus Birkenpollen Prostaglandin-ähnliche Substanzen freigesetzt werden und Isoprostane, welche Prostaglandin-ähnliche Substanzen sind, die Adhäsion von PMN an Endothelzellen vermitteln [249], könnte die Adhäsion auch durch die PGE₂-ähnlichen Substanzen vermittelt sein. Auch ist beschrieben, daß LTB₄ eine Adhärenz von neutrophilen Granulozyten bewirkt [171], somit könnten auch die LTB₄-ähnlichen Substanzen freigesetzt aus Birkenpollen eine Adhärenz von PMN an Pollen hervorrufen.

Nach zwei Stunden Inkubationszeit der PMN von Allergikern mit Birkenpollen kommt es zu einer Destruktion von Pollen. Diese Destruktion könnte zu erneuter

Allergenfreisetzung führen und damit zur Spätphase der Soforttypreaktion beitragen.

Da neutrophile Granulozyten Rezeptoren für LTB_4 besitzen, wurden die neutrophilen Granulozyten mit einem selektiven Leukotrien B_4 -Rezeptor-Antagonisten (LY293111) vorinkubiert und geprüft, ob Lamellenbildung und Adhärenz beeinflusst werden können. Tatsächlich wird dadurch die Wechselwirkung zwischen Zellen und Pollen signifikant gehemmt, aber nicht vollständig aufgehoben. Diese Hemmung spricht für eine Beteiligung von Leukotrien B_4 bei der Pollen-Neutrophilen-Interaktion. Dies Befund paßt zu der in der Literatur beschriebenen Adhärenz von neutrophilen Granulozyten vermittelt durch LTB_4 [171].

Im Migrationsassay konnte zudem gezeigt werden, daß Pollenüberstände eine Migration von neutrophilen Granulozyten bewirken, die offenbar auf der Freisetzung von chemotaktischen Faktoren aus Pollen beruht.

Somit konnte in zwei unterschiedlich aufgebauten Versuchsansätzen (Hemmungs- und Migrationsassays) gezeigt werden, daß es Wechselwirkungen zwischen neutrophilen Granulozyten und Birkenpollen gibt; diese Wechselwirkung stellt möglicherweise die pathophysiologische Rolle von PMN in der initialen Phase einer allergischen Reaktion vor der Sensibilisierungs- und Auslösephase dar. Anhand der morphologischen Untersuchungen der PMN konnte auch nachgewiesen werden, daß die Freisetzung chemotaktischer Substanzen aus Birkenpollen ausreichend war, um eine Stimulierung der Zellen zu bewirken. Aufgrund dieser Tatsache und der in der Literatur aufgeführten physiologischen Konzentrationen von LTB_4 kann die Aussage getroffen werden, daß die in dieser Arbeit gemessene Freisetzung LTB_4 -ähnlicher Substanzen aus Birkenpollen einer physiologisch relevanten Konzentration entspricht.

Die Wechselwirkung zwischen Birkenpollen und PMN führt auch zu einer Stimulation der Zellen. Unter der Fragestellung der Aktivierbarkeit der neutrophilen Granulozyten bei Inkubation mit Birkenpollen wurden im Überstand die Aktivierungsmarker der neutrophilen Granulozyten, das Interleukin-8 (IL-8), die Myeloperoxidase (MPO) und das Humane Neutrophile Lipokalin (HNL) bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß Pollen als Stimulus der neutrophilen Granulozyten

zu einer Freisetzung sowohl von IL-8, MPO als auch von HNL führten. Die Freisetzung von MPO spricht für eine Degranulation der neutrophilen Granulozyten und ist somit ein Indikator für die Aktivierung der Zellen. HNL ist ein Neutrophilen-spezifischer Marker und wird ebenso wie MPO bei Aktivierung der PMN freigesetzt. IL-8 besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, wird aber auch von den Zellen selbst nach Stimulation freigesetzt. Alle genannten Parameter wurden somit nach Inkubation der PMN mit Pollen freigesetzt, was zeigt, daß PMN durch Pollen aktiviert werden. Beim Vergleich von PMN von Allergikern und Nicht-Allergikern ließ sich allerdings kein Unterschied hinsichtlich der IL-8-Freisetzung nachweisen ($p=0,32$). Allerdings war nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 4 von 6 Allergikern eine IL-8-Freisetzung aus den PMN zu messen (22-169 $\mu\text{g/l}$), wohingegen bei den Nicht-Allergikern nur 1 von 7 eine IL-8-Freisetzung zeigte (42 $\mu\text{g/l}$).

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß Birkenpollen neben Gesamtprotein und Majorallergen Bet v 1 auch Leukotrien B_4 (LTB_4)-ähnliche und Prostaglandin E_2 (PGE_2)-ähnliche Substanzen freisetzen. Die Gesamtprotein-Freisetzung aus Birkenpollen ist sowohl temperatur- wie auch zeitabhängig, aber nur gering pH-abhängig, während die Freisetzung des Majorallergens Bet v 1 sowohl temperatur-, zeitabhängig und pH-abhängig ist. Die Bet v 1-Freisetzung verlief allerdings langsamer als die Freisetzung von Eicosanoid-ähnlichen-Substanzen aus Pollen, der frühe Anstieg der Bet v 1-Freisetzung war in den ersten Minuten der Inkubationszeit somit nicht so stark wie bei den Eicosanoiden. Es kann somit die Hypothese aufgestellt werden, daß die Allergenwirkung im Vergleich zur Wirkung der Eicosanoide erst zeitverzögert auftritt, so daß den PMN in der initialen Phase der allergischen Sensibilisierung eine Rolle zugeschrieben werden muß.

Der bedeutendste Befund dieser Arbeit ist, daß in Birkenpollenüberständen sowohl Mengen von Leukotrien B_4 (LTB_4) und die Cysteinyl-Leukotriene Leukotrien $C_4/D_4/E_4$ ($\text{LTC}_4/D_4/E_4$) sowie Prostaglandin E_2 (PGE_2) durch Kreuzreaktivität im ELISA nachgewiesen werden konnten. Die beschriebenen Substanzen müssen allerdings als LTB_4 -, $\text{LTC}_4/D_4/E_4$ bzw. PGE_2 -ähnliche Substanzen bezeichnet werden, da die Vorstufe der Leukotriene, die

Arachidonsäure (vgl. *Abb. 5-1*), in Pollen nicht vorhanden ist, sondern Lipidmediatoren von Linol- und Linolensäure generiert werden (*Abb. 4.2.4-1*).

Dieses Ergebnis ist aus zwei Gründen sehr interessant. Erstens besitzen neutrophile Granulozyten sowohl Rezeptoren für LTB₄ [56] als auch für PGE₂ [247] und zweitens haben Leukotriene chemotaktische sowie bronchokonstriktorische und Prostaglandine immunmodulatorische Wirkungen.

Die Birkenpollen wurden in Puffer (RPMI 1640 bzw. PBS) inkubiert und in den Überständen LTB₄, LTC₄/D₄/E₄ und PGE₂ mit einem käuflich zu erwerbenden ELISA gemessen. Hierbei wurden die Eicosanoide mit immunologischen Methoden quantifiziert, d. h. LTB₄, LTC₄/D₄/E₄ bzw. PGE₂ mit spezifischen Antikörpern im Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachgewiesen. Die Arachidonsäure als Vorstufe von Leukotrienen und Prostaglandinen ist nur in tierischen Zellen vorhanden, wurde aber auch in einigen Pflanzen, wie z. B. Sojabohnen [49], Kartoffeln [215] und Tulpen [187], nicht aber in Pollen beschrieben. Beim Abbau der Arachidonsäure werden durch das Enzym Cyclooxygenase Prostaglandine und Thromboxane und über die Lipoxygenase Leukotriene generiert (*Abb 5-1*). Es gibt drei verschiedene Lipoxygenasen: 5-Lipoxygenase [176], 12-Lipoxygenase [222] und 15-Lipoxygenase [165]. Bei Patienten mit Asthma bronchiale ist in neutrophilen Granulozyten eine erhöhte Aktivität der 5-Lipoxygenase nachgewiesen worden [154]. Hemmstoffe der 5-Lipoxygenase sind: Zileuton [44], Caffeic acid [125], Ketokonazol [16] und NDGA (Nordihydroguaiaretic acid) [105]. Hemmstoffe der Cyclooxygenase sind Indomethacin [214], Acetylsalicylsäure und Naproxen [213].

Im Folgenden soll zunächst auf die biologische Wirkung dieser Substanzen (LTB₄, LTC₄/D₄/E₄ und PGE₂) eingegangen werden.

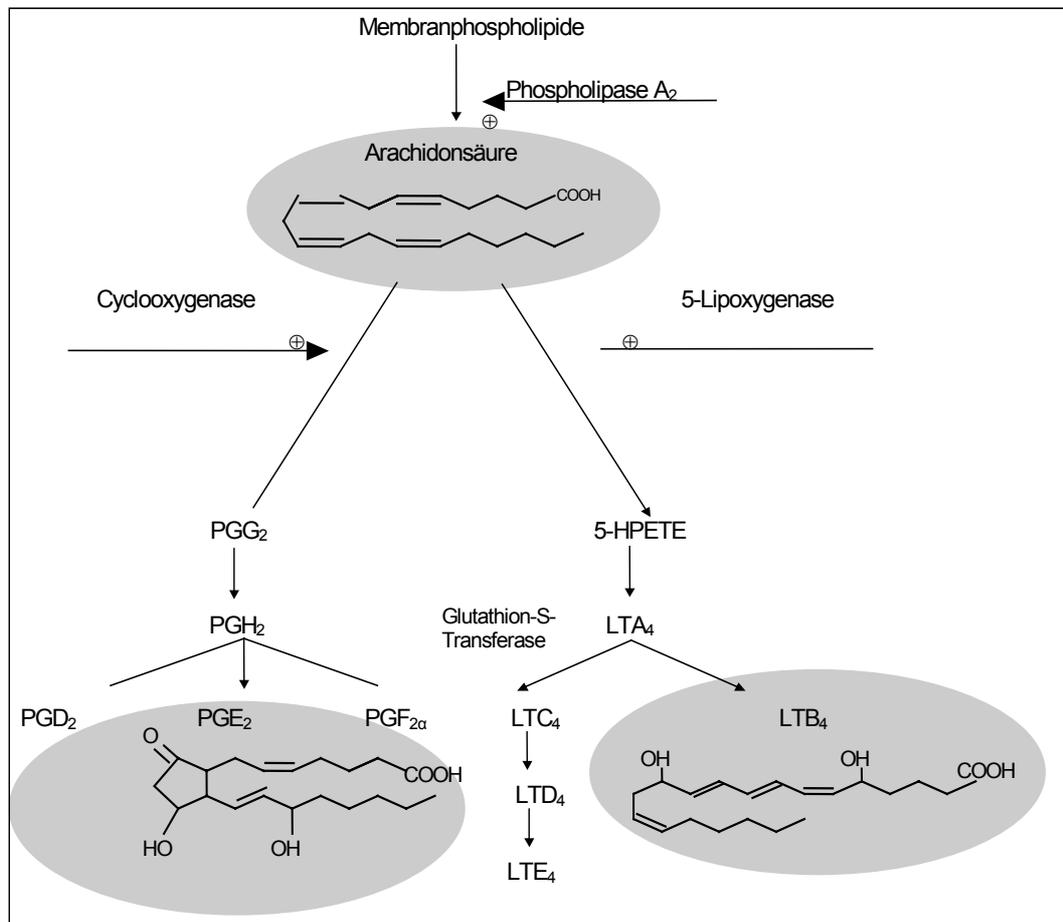


Abb 5-1 Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen aus Arachidonsäure über Lipoxygenase bzw. Cyclooxygenase in tierischen Zellen.

LTB₄

Die in der Literatur angegebenen *LTB₄*-Konzentrationen, die zu Effekten wie der Chemotaxis, Chemokinesis und Aggregation der PMN führen, liegen im Bereich von 3,36 pg/ml bis 336.000 pg/ml [230; 26; 77; 84; 171; 41; 174; 189]. Da in unseren Versuchen 229 pg *LTB₄*-ähnliche Substanzen/ml RPMI 1640 bzw. 250 pg *LTB₄*-ähnliche Substanzen/ml PBS je 1×10^6 Birkenpollen freigesetzt wurden, liegen die Ergebnisse im unteren physiologischen Bereich der in der Literatur beschriebenen Konzentrationen. *LTB₄* wird aus fast allen Zellen freigesetzt, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind. Es handelt sich dabei um neutrophile [29; 201], eosinophile [85] und basophile Granulozyten [78], Monozyten [33], Makrophagen [65; 77], Keratinozyten [92], Mastzellen [80] und dendritische Zellen [198]. *LTB₄* ist ein starker chemokinetischer und chemotaktischer Faktor für neutrophile Granulozyten [77] und fördert die Migration von neutrophilen Granulozyten durch das Lungenepithel [114]. *LTB₄* hat ebenfalls eine, wenn auch schwächere, chemotaktische Wirkung auf eosinophile Granulozyten [163], Monozyten [53] und Fibroblasten [152]. *LTB₄* führt neben einer Chemokinese und Chemotaxis auch zur Aggregation [77], Degranulation [85], Adhärenz [171] und Produktion von Sauerstoffradikalen [28] in neutrophilen Granulozyten. In niedrigeren Konzentrationen ($3,9 \times 10^{-10}$ M) löst *LTB₄* eine Chemotaxis und Chemokinese der PMN aus [79], bei höheren Konzentrationen ($1,0 \times 10^{-7}$ M) kommt es zur Aggregation, Degranulation und Produktion von Sauerstoffradikalen [149]. Durch *LTB₄* wird eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Ödembildung der Haut [26] und die Produktion eines viskösen Schleims in der Lunge induziert [143]. Untersuchungen haben gezeigt, daß *LTB₄* bei der Spätphase von allergischen Reaktionen [251] und speziell des allergisch bedingten Asthma bronchiale eine Rolle spielt [62] und in der bronchialen Lavage [242] und im Sputum von Asthmatikern [167] sowie in der nasalen Lavage von Rhinitikern [212] nach Allergenexposition nachgewiesen worden ist. In der Bronchiallavage von Patienten mit Asthma bronchiale [132] sowie in der nasalen Lavage atopischer Patienten, nach nasaler Provokation mit Pollenextrakten, sind erhöhte Werte von *LTB₄* nachgewiesen worden [81]. Bei *in vitro*-Untersuchungen von Hautbiopsien und *in vivo*-Untersuchungen von atopischer Haut anhand einer Hautkammer ist *LTB₄* in erhöhter Konzentrationen nachgewiesen worden [124]. Bei intradermalen

Injektion von LTB₄ (1 nmol und 2 nmol) bei gesunden nicht-atopischen Versuchspersonen wurden kleine erythematöse Läsionen festgestellt, die meist über zwei bis vier Stunden, manchmal sogar 12 bis 24 Stunden persistierten [6]. LTB₄ (0,15-1,5 nmol) führt nach intradermaler Injektion bei nicht-atopischen Patienten zu länger als 4 Stunden anhaltender Induration und perivaskulärer Infiltration mit neutrophilen Granulozyten [41]. Bei intraperitonealer Injektion im Tiermodell haben 10 nmol LTB₄ einen starken migrationsfördernden Effekt auf peritoneale neutrophilen Granulozyten zur Folge [189]. LTB₄ hat eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von T-Lymphozyten [210]. Flavonoide wirken hemmend auf die Freisetzung von LTB₄ aus neutrophilen Granulozyten [104]. Geblockt werden kann die Produktion des Leukotrien B₄ auch durch selektive Leukotrien B₄-Rezeptor Antagonisten, wie CP-105696 [217], SC-41930 [225] und LY293111 [111]. LTB₄ spielt bei der Antigen-induzierten pulmonalen Reaktion zusammen mit den Cysteinyl-Leukotrienen (LTC₄/LTD₄/LTE₄) eine Rolle. Zusätzlich ist die Kombination von LTB₄- und Cysteinyl-Leukotrienen-Rezeptor-Antagonisten möglicherweise eine nützliche Therapieoption beim Asthma bronchiale [199].

LTC₄/D₄/E₄

Interessanterweise wurde in den Pollenüberständen auch Cysteinyl-Leukotrien-(LTC₄, LTD₄, LTE₄) ähnliche Substanzen nachgewiesen. Auch diese befinden sich im physiologisch wirksamen Bereich [41]. Dieses Ergebnis ist besonders erwähnenswert, da Cysteinyl-Leukotriene eine Bronchokonstriktion auslösen können, die 1000-fach stärker ist als die Wirkung von Histamin [66; 55] und eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Asthma bronchiale spielen. Im Sputum von Asthmatikern sind erhöhte Konzentration der Cysteinyl-Leukotriene nachgewiesen worden [242] und sie werden sowohl in der Frühphase [51] wie auch in der Spätphase [37; 122] der asthmatischen Reaktion freigesetzt. LTE₄ führt zum Anstieg der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Respirationstrakt [131]. In der Asthmatherapie werden erfolgreich Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten wie z. B. Montelukast verwendet [4]. Auch bei der Auslösephase der Rhinoconjunctivitis allergica spielen die Cysteinyl-Leukotriene eine Rolle, da nasale Antigen-Provokation zur vermehrten Freisetzung dieser Lipidmediatoren

führt [148]. LTC₄ und LTD₄ führt nach intradermaler Injektion zu dosisabhängiger Erythem- und Ödembildung [41].

Freigesetzt werden die Cysteinyl-oder auch Sulfidopeptid-Leukotriene aus Mastzellen [158], Monozyten [88], basophilen, [155] eosinophilen [168] und neutrophilen [173] Granulozyten.

Damit ist zu vermuten, daß Birkenpollen neben der bekannten Wirkung durch Allergene eine direkte bronchokonstriktorische Wirkung besitzen könnten. Dadurch könnte sich auch teilweise die in der Klinik nachgewiesene Wirkung von Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (z. B. Montelukast) erklären, [138; 180] da die direkte bronchokonstriktorische Wirkung der Pollen durch den Einsatz der Rezeptor-Antagonisten gehemmt wird.

PGE₂

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben auch gezeigt, daß aus Birkenpollen PGE₂-ähnliche Substanzen in physiologischen Konzentrationen freigesetzt werden. Neutrophilen Granulozyten besitzen Rezeptoren für Prostaglandin E₂ (EP2 und EP4) [247] und PGE₂ wird in Monozyten [89], aber auch in Makrophagen, Lymphozyten [87], Epithelzellen und Stromazellen [89] gebildet, gespeichert und bei Bedarf aus den Zellen freigesetzt und bewirkt eine Bronchodilatation [106]. Im Bronchialepithel von Asthmatikern ebenso wie in den Nasenpolypen von Allergikern werden signifikant erhöhte Konzentrationen an PGE₂ beim Vergleich mit Normalpersonen gemessen [116; 241]. PGE₂ inhibiert die Interleukin-2-Produktion von T-Lymphozyten [89] und die Freisetzung von TH₁, aber nicht von TH₂-Lymphokinen aus T-Lymphozyten [23]. HÄGERMARK hat die pruritogene Wirkung von PGE₂ [96] nachgewiesen. PGE₂ ist in der Haut bei Patienten mit atopischem Ekzem im Vergleich zu normaler nicht-atopischer Haut erhöht (128,3 ± 27,3 ng / gm im Vergleich zu 27,1 ± 9,8 ng / gm) [76]. Auch bei Auslösung des allergischen Kontaktekzems durch Allergene wie Nickel oder Chrom ließen sich PGE₂-Spiegel von 27 ng/ml im Sekret der Saugblasen nachweisen [15]. Bei intradermaler Injektion von PGE₂ (1 nmol und 2 nmol) bei zehn gesunden nicht-atopischen Probanden wurde bei allen Versuchspersonen durch die Injektion eine Quaddel und ein prominentes Erythem ausgelöst. Bei Kombination der intradermalen Injektion von PGE₂ und LTB₄ wurde akut eine Quaddel und ein

Erythem ausgelöst. Quaddel und Erythem waren nach vier Stunden immer noch vorhanden und die Reaktion war stärker, als die Summe der einzelnen Hautreaktionen von PGE₂ und LTB₄ [6]. OKAZKI und Mitarbeiter sammelten nasale Sekrete von symptomatischen Pollinotikern und fanden Prostaglandin E bei sechs von zwölf Probanden [170] und nasale Stimulation mit der Hausstaubmilbe *Pteronyssinus dermatophagoides* führt zu einem Anstieg von PGE. PGE₂ führt zu einer Bronchodilatation [106]. Da PGE₂ in der Nasenschleimhaut bei Patienten mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht ist, wird eine Beteiligung dieser Mediatoren an der Genese der allergischen Rhinitis [221] und am Asthma bronchiale diskutiert [146; 221; 241]. Die physiologische Konzentration für die Proliferation von T-Lymphozyten [98] und für die ziliare Schlagfrequenz der oberen Atemwege liegt im Bereich von 3.470 bis 3.470.000 pg/ml [206]. Die in dieser Arbeit gemessene Freisetzung von 954 bis 1.751 pg PGE₂/ml RPMI 1640 bzw. PBS je 1x10⁶ Birkenpollen liegt somit unterhalb der in der Literatur angegeben niedrigsten physiologischen Konzentration. Aufgrund der Spannweite der Konzentrationsangaben für physiologische Effekte und wegen höherer PGE₂-Konzentration in direkter Umgebung der Birkenpollen, könnte es sich dabei um physiologische Konzentrationen handeln. Wichtig sind auch die immunmodulatorischen Wirkungen von PGE₂: Inkubation von dendritischen Zellen mit PGE₂ führt zu einer Immunantwort in Richtung TH₂-Antwort des Immunsystems [240]. Es ist beschrieben worden, daß PGE₂ die Interleukin-12-Freisetzung aus dendritischen Zellen hemmt [118]. IL-12 wiederum hat einen direkten Einfluß auf die Entwicklung von IFN_γ-produzierender Zellen, welche wichtig ist für die zellvermittelte Immunantwort. Inkubation von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) mit PGE₂ führt dazu, daß diese Zellen zu potenten Stimulatoren der T-Zellen werden [117]. PGE₂ 'primed' T-Lymphozyten zu einer Produktion von Interleukin-4, Interleukin-10 und Interleukin-13 [59] und auch dendritische Zellen, die mit PGE₂ stimuliert wurden rufen eine TH₂-Antwort hervor [240]. Die Wirkung PGE₂-ähnlicher Substanzen im Hinblick auf ihre immunmodulatorische Wirkung ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit gewesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Pollen neben Allergenen physiologisch wirksame Konzentrationen an LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen freisetzen. Diese Substanzen sind wichtig bei der initialen Phase der allergischen Reaktion (LTB₄) und besitzen auch immunmodulatorische Wirkungen in Richtung Th₂, d. h. in Richtung der Ausbildung einer allergischen Reaktion (PGE₂).

Um die oben beschriebenen aus Pollen freigesetzten gemessenen Leukotrien- und Prostaglandin-ähnlichen Substanzen genauer charakterisieren zu können, muß zunächst auf den Lipidstoffwechsel der Pflanzen weiter eingegangen werden: In Pollen und in den meisten Pflanzen ist keine Arachidonsäure nachgewiesen worden, daher können hier keine Eicosanoide entstehen. In Pflanzen entstehen über drei Enzyme und dreifache β -Oxidation aus der Linolensäure die Jasmonsäure (*Abb. 5-2*), Isoprostane über nicht-enzymatische Autooxidation [108] und HODE (Hydroxyoctadecadiensäure) über das Enzym 13-Lipoxygenase oder über Autooxidation (*Abb.5-3*) [73].

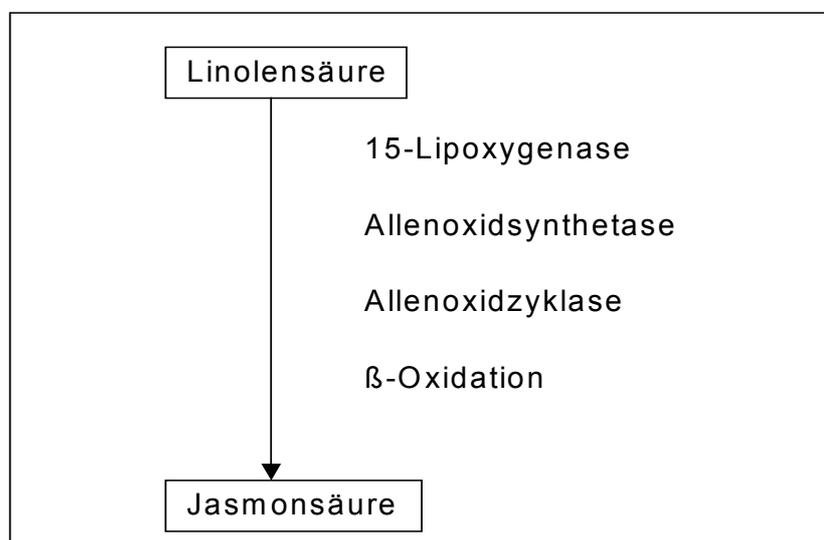


Abb 5-2 Synthese von Jasmonsäure aus Linolensäure in pflanzlichen Zellen.

Isoprostane sind Prostaglandin-ähnliche Komponenten, die in tierischen und pflanzlichen Zellen vorkommen [156]. Das erste, in Säugetierorganismen genauer untersuchte Isoprostan ist 8-epi-PGF_{2α}, das zur Gruppe der F₂-Isoprostane gehört und eine bronchokonstriktorische Wirkung besitzt [120] und eine Adhäsion der PMN an Endothelzellen vermittelt [249]. Auch in der bronchialen Lavage von Asthmatikern, die mit einem inhalativen Allergen provoziert worden sind, wurden erhöhte Konzentrationen an Isoprostan F₂ nachgewiesen [67]. Bei Patienten mit Nikotinabusus sind im Urin erhöhte Konzentrationen an Isoprostan F₂ gemessen worden [157]. Von IMBUSCH und MUELLER [108] sind in frischen Birkenpollen Isoprostane in großen Mengen mittels HPLC nachgewiesen worden. Die Isoprostane aus Pflanzen werden auch als Dinor-Isoprostane bezeichnet, da sie zwei Methylgruppen weniger besitzen als die tierischen Isoprostane. Es gibt Hinweise, die darauf hindeuten, daß die in den Pollenüberständen gemessene PGE₂-ähnliche Substanz einem Isoprostan entspricht.

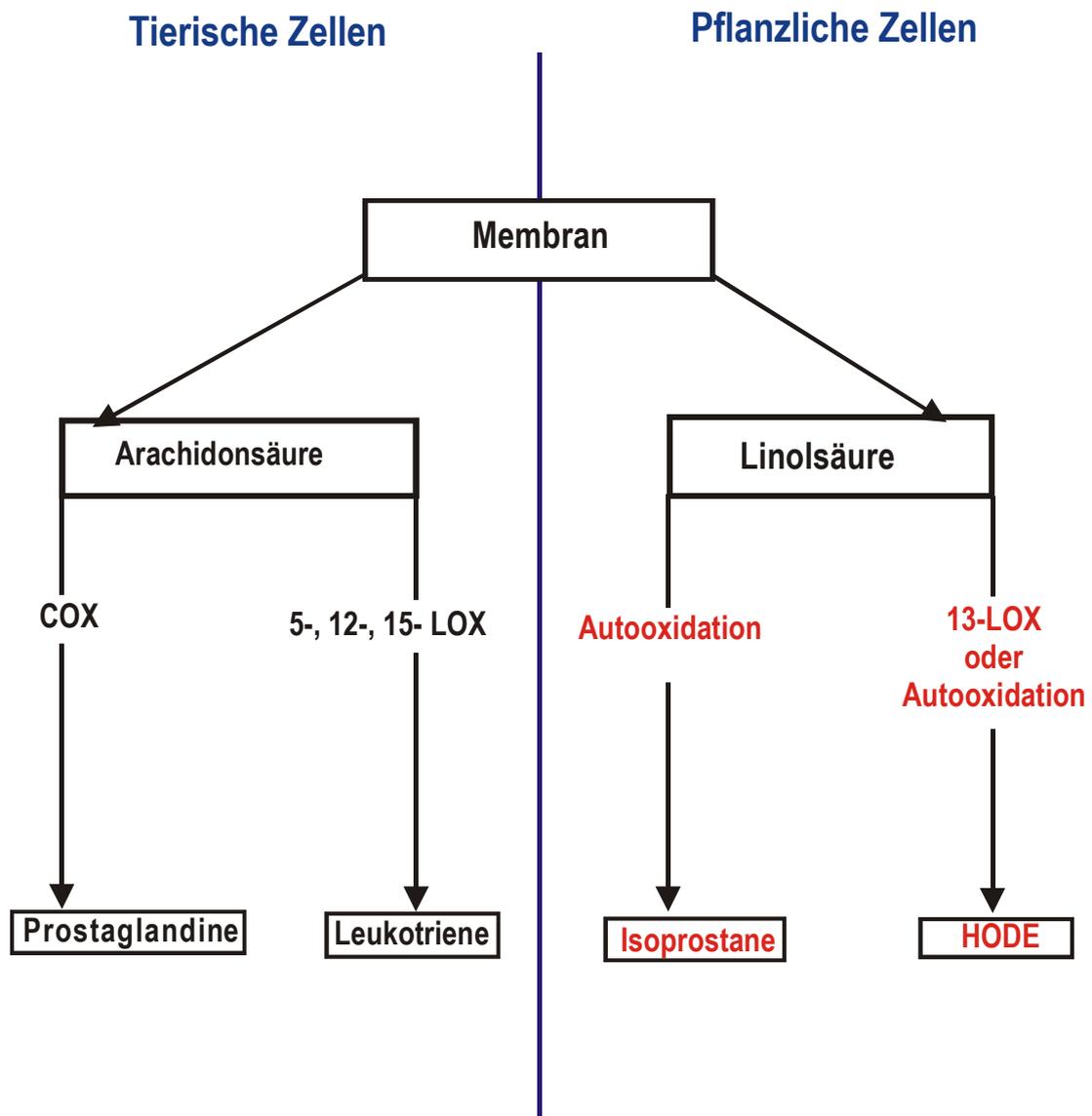


Abb. 5-3 Synthese von Leukotrienen bzw. Prostaglandinen aus tierischen Zellen und Isoprostanen bzw. HODE aus pflanzlichen Zellen.

Bei den in dieser Dissertation in Pollensuspensionen gemessenen LTB₄-ähnlichen Substanzen könnte es sich um HODE (Hydroxyoctadecadiensäure) handeln, einem Mediator, der in Pflanzen über das Enzym 13-Lipoxygenase oder durch Autooxidation vermittelt entsteht [73] und der chemotaktische [99] und degranulationsfördernde [236] Wirkungen auf PMN besitzt. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstrichen, daß in dieser Arbeit mittels Westernblot gezeigt wurde, daß in Birkenpollen eine Lipoxygenase enthalten ist. Tatsächlich wurden mittels HPLC große Mengen an Linol- und Linolensäure sowie deren monohydroxylierten Derivate in Birkenpollenextrakten nachgewiesen. Welche dieser Substanzen für die beobachteten Effekte verantwortlich ist und ob sie auf enzymatischem oder autooxidativem Wege entstanden ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt von den Befunden dieser Arbeit nicht abgeleitet werden. Es wurde auch gezeigt, daß aus älteren Pollen mehr LTB₄- und PGE₂-ähnliche Substanzen freigesetzt werden. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, daß es sich hierbei um einen Alterungsprozeß bzw. Autooxidationsprozeß, der zur Freisetzung von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus Pollen führt, handelt. Wie oben besprochen, werden die Leukotrien-ähnlichen Substanzen HODE (Hydroxyoctadecadiensäure) durch Autooxidationsprozesse synthetisiert und auch die Prostaglandin-ähnlichen Komponenten, auch Isoprostane genannt, entstehen durch nicht-enzymatische Autooxidationsprozesse. Dies korreliert mit unserem Ergebnis, daß bei Birkenpollen ein durch Autooxidation hervorgerufenener Alterungsprozeß mit erhöhter Freisetzung von LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen vorliegt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aus Birkenpollen LTB₄-ähnliche Substanzen, möglicherweise HODE (Hydroxyoctadecadiensäure) und eine PGE₂-ähnliche Substanz, eventuell ein Isoprostan, in physiologischen Konzentrationen freigesetzt wird.

Die Freisetzung der Leukotrien- und Prostaglandin-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen ist sowohl dosis-, zeit-, pH- und temperatur-abhängig. PGE₂ ist in der Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis signifikant erhöht und eine Beteiligung dieser Mediatoren an der Genese der allergischen Rhinitis [221]

und am Asthma bronchiale wird diskutiert [146; 221; 241]. Auch den Leukotrienen wird eine mögliche pathophysiologische Funktion bei bestehender Allergie und Asthma bronchiale zugedacht [200]. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, daß schon in den ersten Minuten nach Kontakt der Birkenpollen mit wäßrigem Milieu der Großteil von LTB₄- und PGE₂-ähnliche Substanzen aus den Birkenpollen freigesetzt wird. Bei pH 9,0 und 37°C wurde die höchste Freisetzung von sowohl LTB₄, LTC₄/D₄/E₄- wie auch PGE₂-ähnlichen Substanzen gemessen. Die Tatsache, daß in der Nasenschleimhaut von Allergikern ein leicht alkalischer pH-Wert von 7,2 bis 8,4 im Vergleich zu pH 5,5 bis 6,5 bei Nicht-Allergikern vorherrscht [144; 71], könnte erklären, warum in der Nasenschleimhaut von Allergikern eine höhere Anzahl von neutrophilen Granulozyten vorzufinden ist [72; 126]. Durch den höheren pH-Wert der Nasenschleimhaut bei Allergikern werden auch vermehrt LTB₄-ähnliche Substanzen aus Pollen freigesetzt, was eine Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten bewirkt [77]. Wie oben beschrieben war die Adhärenz der PMN von Birkenpollen-Allergikern stärker als bei den PMN von Kontrollpersonen, die Freisetzung von LTB₄-ähnlichen Substanzen jedoch in beiden Gruppen bei gleicher Pollenkonzentration identisch. Die PMN der Birkenpollen-Allergiker könnten demnach schon bei LTB₄-Konzentrationen stimuliert werden, die bei den PMN der Kontrollpersonen nicht ausreichend sind, um eine Adhärenz auszulösen. Folglich führen bei Birkenpollen-Allergikern geringere Pollenkonzentrationen bzw. Konzentrationen von LTB₄-ähnlichen Substanzen zur Stimulierung der PMN. Aufgrund dieser Erkenntnisse können die PMN der Birkenpollen-Allergiker als 'geprimed' bezeichnet werden, d. h. sie besitzen eine stärkere Reaktionsbereitschaft, mit der sie auf Veränderung von Umgebungsparametern reagieren. Die histologisch nachgewiesene Adhärenz der PMN an Birkenpollen kann durch die Freisetzung von LTB₄-ähnlichen Substanzen aus den Pollen als Migrationsstimulus mit nachfolgender Adhärenz begründet werden. Aus diesen Ergebnissen könnte sich auch eine therapeutische Schlußfolgerung ergeben: Kann die allergische Typ I-Reaktion durch Einnahme von LTB₄-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden? In der Literatur ist bereits beschrieben worden, daß diese selektiven Antagonisten (z. B. LY293111) zur Hemmung der Chemotaxis, Adhärenz und Aggregation der PMN geführt haben [111].

Die Bedeutung des Befundes der Präsenz von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen in Pollen für den Allergiker wird auch dadurch unterstrichen, daß Pollen mit hoher allergener Potenz wie Birkenpollen, Lieschgraspollen und Beifußpollen signifikant mehr Leukotrien B₄-ähnliche Substanzen freisetzen als nicht-allergene Kieferpollen. Eine Freisetzung von Prostaglandin-ähnlichen Substanzen war bei allen vier untersuchten Pollenarten hingegen in vergleichbaren Konzentrationen nachzuweisen, d. h. die immunmodulatorische Wirkung in Richtung TH₂ könnte grundsätzlich bei Exposition gegenüber Pollen, unabhängig von ihrer Allergenität, stattfinden. Experimente, die diese Hypothese belegen würden, waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Auch ist in der Literatur darüber nichts bekannt. Bekannt ist jedoch, daß LTB₄ eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten besitzt. Neutrophile Granulozyten wiederum spielen möglicherweise eine Rolle bei der Initiierung der allergischen Reaktion. Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, daß die in den hochallergenen Pollen vorhandenen Konzentrationen an LTB₄-ähnlichen Substanzen zusätzlich zu dem vorhandenen Allergen eine Wirkung entfalten, die die Allergenität der Pollen erhöht und damit beim Pathomechanismus der allergischen Reaktion eine Rolle spielen könnten.

6. Zusammenfassung

Epithelzellen der Nasenschleimhaut sind die ersten Zellen, die Kontakt zu einem Allergen (z. B. Birkenpollen) bekommen. Neben den Epithelzellen befinden sich in der Nasenschleimhaut besonders von Allergikern [177; 178] auch neutrophile Granulozyten. Daher war Ziel dieser Arbeit, die Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Initiierung einer allergischen Reaktion zu untersuchen.

Es wurde gezeigt, daß es Wechselwirkungen zwischen neutrophilen Granulozyten und Birkenpollen *in vitro* gibt, die zu einer Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8), Myeloperoxidase (MPO) und Humanem Neutrophilen Lipokalin (HNL) aus den neutrophilen Granulozyten führen.

Bei der PMN-Birkenpollen-Interaktion zeigten PMN von Allergikern eine stärkere Tendenz, führende Lamellen auszubilden. Durch Verwendung eines selektiven LTB₄-Rezeptor-Antagonisten (LY293111) konnte die Wechselwirkung zwischen Birkenpollen und neutrophilen Granulozyten gehemmt, aber nicht vollständig aufgehoben werden.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, daß die Überstände von Pollensuspensionen Eicosanoid-ähnliche Substanzen pH-, temperatur-, zeit- und dosisabhängig freigesetzt werden. Beim Vergleich der Freisetzung von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus unterschiedlichen Pollenarten zeigte sich, daß nur bei hochallergenen Pollen wie Birkenpollen, Beifußpollen und Lieschgraspollen eine Freisetzung von LTB₄-ähnlichen Substanzen im Überstand in substantiellen Konzentrationen zu messen ist, nicht aber in nicht-allergenen Kieferpollen.

Es ließ sich auch ein Alterungsprozeß der Pollen nachweisen: Je älter die Pollen werden, um so größer ist die Freisetzung von LTB₄- und PGE₂-ähnlichen Substanzen, ein Hinweis auf die Generierung durch autooxidative Prozesse.

In dieser Arbeit wurde somit erstmals gezeigt, daß aus Pollen sowohl proinflammatorisch wirksame Substanzen wie Leukotrien B₄-ähnliche Substanzen als auch Substanzen mit immunmodulatorischer Wirkung (Prostaglandin E₂-ähnliche Substanzen) freigesetzt werden. Mittels Westernblot wurde gezeigt, daß in Birkenpollen eine Lipoxygenase enthalten ist. Die Leukotrien B₄-ähnlichen Substanzen entsprechen möglicherweise den durch HPLC identifizierten

monohydroxilierten Derivaten der Linol- und Linolensäure – Hydroxyoctadecadiensäure (HODE) und Hydroxyoctadecatriensäure (HOTE) – während die Prostaglandin-ähnlichen Substanzen evtl. der Gruppe der Isoprostane, (auch Prostaglandin-ähnliche Komponenten genannt), entsprechen.

Die Befunde dieser Arbeit lassen die initiale Phase einer Soforttyp-Allergie im neuen Licht erscheinen: Polleninhaltsstoffe – jenseits des Allergens – tragen direkt zur Entzündung bei und könnten so nicht nur zur Allergieentstehung, sondern auch zur Aggravation einer bestehenden allergischen Entzündung beitragen. Unter therapeutischen Aspekten könnte eine Inhibierung der Wirkung der LTB₄-ähnlichen Substanzen möglicherweise als anti-allergisches Medikament eingesetzt werden, da LTB₄ zu einer bronchialen Hyperreaktivität führt, die es zu hemmen gilt.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Ahuja, S.K., Ozcelik, T., Milatovitch, A., Francke, U., Murphy, P.M.
Molecular evolution of the human interleukin-8 receptor gene cluster.
Nat. Genet. 2/1 (1992) 31 – 36
- 2) Albert, D.H., Snyder, F.
Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages.
Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation.
J Biol. Chem. 258 (1983) 97 – 102
- 3) Alexander, S.P.H., Peters, J.A.
Receptor and ion channel nomenclature.
Trends Pharmacol. Sci. (1997) 50 – 51
- 4) Allegra L, Canonica GW, Donner CF, Fogliani V, Melillo G, Mistretta A, Paggiaro PL, Rossi GA, Sanguinetti CM, Vignola M.
Asthma controller therapy: role of antileukotrienes, a new therapeutic class.
Monaldi.
Arch. Chest. Dis. 54 (1999) 136 – 145
- 5) Allen, R. A., Erickson, R. W., Jesaitis, A. J.
Identification of a human neutrophil protein of Mr 24 000 that binds N-formyl peptides: co-sedimentation with specific granules.
Biochim Biophys Acta 991 (1989) 123 – 133
- 6) Archer, C.B., Page, C.P., Juhlin, L., Morley, J., MacDonald, D.M.
Delayed synergism between leukotriene B₄ and prostaglandin E₂ in human skin.
Prostaglandins 33 (1987) 799 – 805

- 7) Atkins, P.C., Norman, M., Zweiman, B., Rosenblum, F.
Further characterization and biologic activity of ragweed antigen—induced neutrophil chemotactic activities in man.
J. Allergy Clin. Immunol. 64 (1979) 251 – 258
- 8) Bachert, C., Ganzer, U.
Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine bei der Rekrutierung von Entzündungszellen an der Nase.
Laryngorhinootologie 72 (1993) 585 – 589
- 9) Bachert, C., Wagemann, M., Hauser, U.
Proinflammatory cytokines: measurement in nasal secretion and induction of adhesion receptor expression.
Int. Arch. Allergy Immunol. 107 (1995) 106 – 108
- 10) Baggiolini, M., Horisberger, U., Martin, U.
Phagocytosis of mast cell granules by mononuclear phagocytes, neutrophils and eosinophils during anaphylaxis.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 67 (1982) 219 – 226
- 11) Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L.
Neutrophil-activating Peptide-1/Interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils.
J. Clin. Invest. 84 (1989) 1045 – 1049
- 12) Baggiolini, M. Neutrophils, interleukin 8 and related chemotactic cytokines.
In: “42. Colloquium Mosbach 1991, Molecular Aspects of Inflammation“, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1991, 25 – 31
- 13) Baggiolini, M.
Neutrophil activation and the role of interleukin-8 and related cytokines.
Int. Arch. Allergy Immunol. 99 (1992) 196 – 199

- 14) Bainton, D.F., Ulliyot, J.L., Farquar, M.E.
The development of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes in human bone marrow. Origin and content of specific and azurophilic granules.
J. Exp. Med. 143 (1971) 907 – 934
- 15) Barr, R.M., Brain, S., Camp, R.D.R., Cilliers, J., Greaves, M.W., Mallet, A.I., Misch, K.
Levels of arachidonic acid and its metabolites in the skin in human allergic and irritant contact dermatitis.
Br. J. Dermatol. 111 (1984) 23 – 28
- 16) Beetens, J.R., Loots, W., Somers, Y., Coene, M.C., Clerck, F. De.
Ketoconazole inhibits the biosynthesis of leukotrienes in vitro and in vivo.
Biochem. Pharmacol. 35 (1986) 883 – 891
- 17) Behrendt, H.
Umwelteinflüsse und Allergie.
Allergo J. 4 (1995) 455
- 18) Behrendt, H., Tomczok, J., Sliwa-Tomczok, W., Kasche, A., Ebner von 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 Clin. Immunol. (1999) 414 – 418
- 19) Behrendt, H., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Risse, U., Huss-Marp, J., Ring, J.
Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization
Int. Arch. Allergy Clin. Immunol. 124 (2001) 121 – 125
- 20) Behrendt, H., Becker, W. M.
Localization, release and bioavailability of pollen allergens: influence of environmental factors.
Curr. Opin. In Immunol. 13 (2001) 709 – 715

- 21) Bennich, H., Ishizaka, K., Ishizaka T., Johansson, S.G.
Comparative antigenic study of E globulin and myeloma IgND.
J. Immunol. 102 (1969) 826-831
- 22) Betz, S. J., Henson, P. M.
Production and release of platelet-activating factor (PAF); dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil.
J. Immunol. 125 (1980) 2756 – 2763
- 23) Betz, M., Fox, S.B.
Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines.
J. Immunol. 146 (1991) 108 – 113
- 24) Bieber, T.
Fc epsilon RII/CD23 on epidermal Langerhans cells.
Res. Immunol. 143 (1992) 445 – 447
- 25) Bieber, T.
Fc Epsilon RI on human epidermal Langerhans cells: An old receptor with new structure and functions
Int. Arch. Allergy Immunol. 113 (1997) 30 – 34
- 26) Björk, J., Dahlén, S.E., Hedquist, P., Arfors, K.E.
Leukotrienes B₄ and C₄ have distinct microcirculatory actions in vivo.
Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res. 12 (1983) 1 – 6
- 27) Blackley, C.H.
Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus aestivus (hay fever or hay asthma)
In: Bailliere, Tindal and Cox (eds.), Ltd, London (1873)
- 28) Bokoch, G.M., Reed, P.W.
Inhibition of neutrophil oxidative response to a chemotactic peptide by inhibitors of arachidonic acid oxygenation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 90 (1979) 481 – 487

- 29) Borgeat, P., Samuelsson, B.
Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes unstable intermediate in formation of dihydroxy acids.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 76 (1979) 2148 – 2152
- 30) Bostock, J.
Case of a periodical affection of the eyes and chest.
Med. Chir. Transact. London 10 (1819) 161 – 165
- 31) Boyden, S.
The chemotactic factor effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes.
J. Exp. Med. 115 (1962) 453 – 466
- 32) Bradford, M.M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 7/72 (1976) 248 – 254
- 33) Bray, M.A., Ford-Hutchinson, A.W., Smith, M.J.H. Leukotrien B₄:
Biosynthesis and biological activities.
In: SRS-A and leukotrienes, Piper, P.J. (Ed.), Wiley, Chichester, 1981, 253 – 270
- 34) Brom, J., Brom, C., König, W.
Basic mechanisms of cellular priming and release of inflammatory mediators.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 94 (1991) 64 – 67
- 35) Brom, J., König, W.
Signal transduction and priming of human neutrophils.
Int. Arch. Allergy Immunol. 99 (1992) 387 – 389

- 36) Brown, H.M., Irving, K.R.
The size and weight of common allergenic pollens.
Acta Allergol. 28 (1973) 132 – 137
- 37) Bruynzeel, P.L., Verhagen, J.
The possible role of particular leukotrienes in the allergen-induced late-phase asthmatic reaction.
Clin. Exp. Allergy 19 (1989) 25 – 32
- 38) Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M., Becker, W. M.
The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity.
Planta 199 (1996) 413 – 415
- 39) Bundgaard, J. R., Sengelov, H., Borregaard, N., Kjeldsen, L.
Molecular cloning and expression of cDNA encoding NGAL: a lipocalin expressed in human neutrophils.
Biochem Biophys Res Commun 202 (1994) 1468 – 1475
- 40) Caillard, C.G., Mondot, S., Zundel, J.L., Julou, L.
Hypotensive activity of PAF-acether in rats.
Agents Actions 12/5-6 (1982) 725 – 730
- 41) Camp, R.D.R., Coutts, A.A., Greaves, M.W., Kay, A.B.
Responses of human skin to intradermal injection of leukotrienes C₄, D₄ and B₄.
Br. J. Pharmac. 80 (1983) 497 – 502
- 42) Capron, M., Morita, M., Woerly, G., Lengrand, F., Gounni, A. S., Delaporte E., Capron, A.
Differentiation of eosinophils from cord blood cell precursors: kinetics of Fc epsilon RI and Fc epsilon RII expression.
Int. Arch. Allergy Immunol. 113 (1997) 48 – 50
- 43) Carini, C., Pini, C., DiFelice, G., Fattorossi, A. Fratazzi, C.
CD23/Fc epsilon RII expression on phytohemagglutinin-A or phorbol-12myristate-13acetate-Ca(2+)-activated human tonsil t cells.
Int. Arch. Allergy Immunol. 101 (1993) 31 – 38

- 44) Carter GW, Young PR, Albert DH, Bouska J, Dyer R, Bell RL, Summers JB, Brooks DW.
5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 256 (1991) 929 – 937
- 45) Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Calzetti, F., Guasparri, I., Rossi, F., Trinchieri, G.
Interferon- γ transcriptionally modulates the expression of the genes for the high affinity IgG-Fc receptor and the 47 kDa cytosolic component of NADPH oxidase in human polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. (1991) 22079 – 22082
- 46) Christie, G., Barton, A., Bolognese, B., Buckle, D. R., Cook, R. M., Hansbury, M. J., Harper, G. P., Marshall L. A., McCord, M. E., Moulder, K., Murdock, P. R., Seal, S. M., Spackman, V. M., Weston, B. J., Mayer, R. J.
IgE secretion is attenuated by an inhibitor of proteolytic processing of CD23 (Fc epsilonRII).
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 3228 – 3235
- 47) Coca, A.F., Grove, E.F.
Studies in hypersensitiveness: XIII. A study of atopic reagins.
J. Immunol. 10 (1925) 445 – 464
- 48) Collison, K.S., Kwaasi, A.A., Parhar, R.S., Al-Sedairy, S.T., Al-Mohanna, F.A.A.
Monomeric IgE evokes a transient calcium rise in individual human neutrophils.
J. Leukoc. Biol. 58 (1995) 459 – 467
- 49) Cook HW, Lands WE.
Further studies of the kinetics of oxygenation of arachidonic acid by soybean lipoxygenase.
Can. J. Biochem. 53 (1975) 1220 – 1231

- 50) Coombs, R.R.A., Gell, P.G.H.
The classification of allergic reactions underlying disease.
In: "Clinical aspects of immunology", Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A., (Eds.),
Davis, Philadelphia, 1963, 317
- 51) Creticos, P.S., Peters, S.P., Adkinson, N.F. Jr.
Peptide leukotriene release after antigen challenge in patients sensitive to
ragweed.
N. Engl. J. Med. 310 (1984) 1626 – 1630
- 52) Currie, A.J., Stewart, G.A., McWilliam, A.S.
Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen
starch granules via c-type lectin and integrin receptors: Implications for
airway inflammatory disease.
J. Immunol. 164 (2000) 3878 – 3886
- 53) Czarnetzki, B.M.
Increased monocyte chemotaxis towards leukotriene B₄ and platelet-
activating factor in psoriasis and atopic eczema.
Clin. Exp. Immunol. 54 (1983) 486 – 492
- 54) D'Amato, Spieksma FTM, 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
- 55) Dahlén, S.E., Hedquist, P., Hammarström, S., Samuelsson, B.
Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi.
Nature 288 (1980) 484 – 486
- 56) Dasari, V.R., Jin, J., Kunapuli, S.P.
Distribution of leukotriene B₄ receptors in human hematopoietic cells.
Immunopharmacology 48 (2000) 157 – 163

- 57) Daubener, W., MacKenzie, C.R.
IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells
is an antiparasitic and antibacterial effector mechanism.
Adv. Exp. Med. Biol. 467 (1999) 517 – 524
- 58) Demetri, G. D., Griffin, J. D.
Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor.
Blood (1991) 2791 – 2808
- 59) Demeure, C.E., Yang, L.P., Desjardins, C., Raynauld, P., Delespesse, G.
Prostaglandin E2 primes naïve T cells for the production of anti-
inflammatory cytokines.
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 3526 – 3531
- 60) Devchand, P.R., Keller, H., Peters, J.M., Vasquez, M., Gonzalez, F.J.,
Wahli, W.
The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control.
Nature 384 (1996) 39 – 43
- 61) Diamond, M. S., Staunton, D. E., de Fougères, A. R., Stacker, S. A.,
Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M. L., Springer, T. A.
ICAM-1 (CD54): A counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18).
J Cell Biol 111 (1990) 2129 – 3139
- 62) Diaz, P., Gonzalez, M.C., Galleguillos, F.R., Ancic, P., Cromwell, O.,
Shepherd, D., Durham, S.R., Gleich, G.J., Kay, A.B.
Leukocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen-
induced late-phase asthmatic reactions.
Am. Rev. Respir. Dis. 139 (1989) 1383 – 1389
- 63) Dinarello, C. A.
Proinflammatory cytokines.
Chest 118 (2000) 503 – 508

- 64) Dixon, F.J., Vasquez, J.J., Weigle, W.O., Cochrane, C.G.
Pathogenesis of serum sickness. A. M. A.
Archives of Pathology 65 (1958) 18 – 28
- 65) Doig, M.V., Ford-Hutchinson, A.W.
The production and characterisation of products of the lipoxygenase
enzyme system released by rat peritoneal macrophages.
Prostaglandins 20 (1980) 1007 – 1020
- 66) Drazen, J.M., Austen, K.F., Lewis, R.A., Clark, D.A., Goto, G., Marfat, A.,
Corey, E.J.
Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in
vivo and in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 77(1980) 4354 – 4358
- 67) Dworski, R., Murray, J.J., Roberts II, L.J., Oates, J.A., Morrow, J.D., Fisher,
L., Sheller, J.R.
Allergen-induced synthesis of F2-isoprostanes in atopic asthmatics.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 169 (1999) 1947 – 1951
- 68) Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner,
H., Kraft, D., Scheiner, O.
Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities
with important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin).
J. Allergy Clin. Immunol. 95 (1995)
- 69) Edwards, S. W.
Polymorphonuclear leukocytes.
In: Biochemistry and physiology of the neutrophil, Edwards, S. W. (Hrsg.),
Cambridge University Press, New York, 1. Auflage, 4
- 70) English, D., Anderson, B.R.
Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear
leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque.
J. Immunol. Methods 5 (1974) 249 – 252

- 71) Fabricant, N.D.
Significance of the pH of nasal secretions in situ.
Arch. Otolaryngol. 33 (1941) 150
- 72) Fahy, J.V., Kim, K.W., Liu, J., Boushy, H.A.
Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation.
J. Allergy Clin. Immunol. 95 (1995) 843 – 852
- 73) Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M., Kindl, H.
All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase.
FEBS Letters 431 (1998) 433 – 436
- 74) Fokkens, W. J., Broekhuis-Fluitsma, D. M., Rijntjes E., Vroom, T. M., Hoefsmid, E. C. M.
Langerhans cells in nasal mucosa of patients with grass pollen allergy.
Immunobiol. 182 (1991) 135 – 142
- 75) Fokkens, W. J., Vinke, J. G., KleinJan A.
Local IgE production in the nasal mucosa: a review.
Am. J. Rhinol 14 (2000) 299 – 303
- 76) Fogh, K., Herlin T., Kragballe K.
Eicosanoids in skin of patients with atopic dermatitis: prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ are present in biologically active concentrations.
J. Allergy Clin. Immunol. 83 (1989) 450 – 455
- 77) Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J.H.
Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes.
Nature 286 (1980) 264 – 265
- 78) Ford-Hutchinson, A.W., Piper, P.J., Samhoun, M.N.
Generation of leukotriene B₄, its all trans isomers and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by rat basophilic leukaemia cells.
Br. J. Pharmacol. 76 (1982) 215 – 220

- 79) Ford-Hutchinson, A.W.
Leukotriene B₄ in inflammation.
Crit. Rev. Immunol. 10 (1990) 1 – 12
- 80) Freeland, H.S., Schleimer, R.P., Schulman, E.S., Lichtenstein, L.M.,
Peters, S.P.
Generation of leukotriene B₄ by human lung fragments and purified human
lung mast cells.
Am. Rev. Respir. Dis. 138 (1988) 389 – 394
- 81) Freeland, H.S., Pipkorn, U., Schleimer, R.P., Bascom, R., Lichtenstein,
L.M., Naclerio, R.M., Peters, S.P.
Leukotrien B₄ as a mediator of early and late reactions to antigen in
humans: The effect of systemic glucocorticoid treatment in vivo.
J. Allergy Clin. Immunol. 83 (1989) 634 – 642
- 82) Gerard, N.P., Gerard, C.
The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin.
Nature (1991) 614 – 617
- 83) Gibson, W.T., Milsom, D.W., Steven, F.S., Lowe, J.S.
Collagenolytic cathepsin activity in rabbit peritoneal polymorphonuclear
leucocyte granules.
Biochem. J. 172/1 (1978) 83 – 89
- 84) Goetzl, E.J.
Mediators of immediate hypersensitivity derived from arachidonic acid.
N. Engl. J. Med. 303 (1980) 822 – 825
- 85) Goetzl, E.J., Pickett, W.C.
The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-
eicosatetraenoic acids (HETEs).
J. Immunol. 125 (1980) 1789 – 1791

- 86) Goldman, D.W., Goetzl, E.J.
Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. Identification of subset of high affinity receptors that transduce the chemotactic response.
J. Exp. Med. (1984) 1027 – 1041
- 87) Goldyne, M.E., Stobo, J.D.
Synthesis of prostaglandins by subpopulations of human peripheral blood monocytes.
Prostaglandins 18/5 (1979) 687 – 695
- 88) Goldyne, M.E., Burrish, G.F., Oliver, C.
A novel eicosanoid is the major arachidonic acid metabolite of cultured human monocytes.
Prostaglandins 30/1 (1985) 77 – 90
- 89) Goodwin, J., Ceuppens, J.
Regulation of the immune response by prostaglandin.
J. Clin. Immunol. 3 (1983) 295 – 315
- 90) Gounni, A. S., Lamkhioued, B., Ochiai, K., Tanaka Y., Delaporte E., Capron, A., Kinet, J. P., Capron, M.
High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites.
Nature 367 (1994) 183 – 186
- 91) Gounni, A. S., Lamkhioued, B., Koussih, L., Ra, C., Renzi, P. M., Hamid, Q.
Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (FcεRI): role for asthma.
FASEB J. 15 (2001) 940 – 949
- 92) Grabbe, J., Rosenbach, T., Czarnetzki, B.M.
Production of LTB₄-like chemotactic arachidonate metabolites from human keratinocytes.
J. Invest. Dermatol. 85 (1985) 527 – 530

- 93) Green, S., Dobrjanski, A., Carswell, E.A., Kassel, R.L., Old, L.J., Fiore, N., Schwartz, M.K.
Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors.
Biochemistry 73 (1976) 381 – 385
- 94) Grote, M.
In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy:
allergens at unexpected sites.
Int. Arch. Allergy Immunol. 118 (1999) 1 – 6
- 95) Hagen, M., Sacco, R. E., Sandor, M., Best, C., Nambu, M., Lynch, R. G.
The Fc epsilon RII/CD23 gene is actively transcribed during all stages of
murine B-lymphocyte development.
Mol. Immunol. 32 (1995) 1245 – 1257
- 96) Hägermark, Ö., Strandberg, K.
Pruritogenic activity of prostaglandin E₂.
Acta Derm. Venereol. 57 (1977) 37 – 43
- 97) Halling, J.L., Hamill, D.R., Lei, M.G., Morrison, D.C.
Identification and characterization of lipopolysaccharide-binding proteins on
human peripheral blood cell populations.
Infect. Immun. 60/3 (1992) 845 – 852
- 98) Hendricks, A., Leibold, W., Kaeffer, V., Schuberth, H.J.
Prostaglandin E₂ is variable induced by bacterial superantigens in bovine
mononuclear cells and has a regulatory role for the T cell proliferative
response.
Immunobiology 201 (2000) 493 – 505
- 99) Henricks, P. A., Engels, F., van der Vliet, H., Nijkamp, F. P.
9- and 13-hydroxy-linoleic acid possess chemotactic activity for bovine and
human polymorphonuclear leukocytes
Prostaglandins 41 (1991) 21 – 27

- 100) Henson, P.M., Johnson, H.B., Spiegelberg, H.L.
The release of granule enzymes from human neutrophils stimulated by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses.
J. Immunol. 109 (1972) 1182 – 1191
- 101) Henson, P. M., Betz, S. J.
Neutrophil and platelet interactions in “allergic” and inflammatory reactions: a role for acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (platelet-activating factor).
Kroc. Found Ser. 14 (1981) 51 –66
- 102) Hoekstra, F. A., Bruinsma, J.
Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen.
Physiol. Plant. 34 (1975) 221 – 225
- 103) Hoeger, P. H., Niggemann, B., Schroeder, P.
Enhanced basal and stimulated PMN chemiluminescence activity in children with atopic dermatitis: stimulatory role of colonizing staphylococci?
Acta Paediatr. 81 (1992) 542 – 546
- 104) Homma, M., Minami, M., Taniguchi, C., Oka, Kitaro, Morita, S., Niitsuma, T., Hayashi, T.
Inhibitory effects of lignans and flavonoids in saiboku-to, a herbal medicine for bronchial asthma, on the release of leukotrienes from human polymorphonuclear leukocytes.
Planta Med. 66 (2000) 88 – 91
- 105) Hope, W.C., Welton, A.F., Fiedler-Nagy, C., Batula-Bernardo, C., Coffey, J.W.
In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity by quercetin.
Biochem. Pharmacol. 32 (1983) 367 – 371
- 106) Hyman, A.L., Spannhake, E.W., Kadowitz, P.J.
Prostaglandins and the lung.
Am. Rev. Respir. Dis. 117 (1978) 111 – 136

- 107) Idriss, H.T., Naismith, J.H.
TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s).
Micros. Res. Tech. 50 (2000) 184 – 195
- 108) Imbusch, R., Mueller, M. J.
Formation of isoprostane F2-like compounds (phytoprostanes F1) from α -linolenic acid in plants.
Free Radic. Biol. Med. 28 (2000) 720 –726
- 109) Ishibashi, K., Kodama, M., Hanada, S., Arima, T.
Tumor necrosis factor-beta and hypercalcemia.
Leuk. Lymphoma 7 (1992) 409 – 417
- 110) Jacobi, H.H., Poulsen, L.K., Reimert, C.M., Skov, P.S., Ulfgren, A.K., Jones, I., Elfman, L.B., Malling, H.J., Mygind, N.
IL-8 and the activation of eosinophils and neutrophils following nasal allergen challenge.
Int. Arch. Allergy Immunol. 116 (1988) 53 – 59.
- 111) Jackson, W.T., Froelich, L.L., Boyd, R.J., Schrementi, J.P., Saussy D.L., Schultz, R.M., Sawyer, J.S., Sofia, M.J., Herron, D.K., Goodson, T., Snyder, D.W., Pechous, P.A., Spaethe, S.M., Roman, C.R., Fleisch, J.H.
Pharmacologic actions of the second-generation leukotriene B₄ receptor antagonist LY293111: In vitro studies.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 288 (1999) 286 – 294
- 112) Jadassohn, J.
Kontaktekzem.
In: "Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten", Lesser, E. (Hrsg.), Springer, Berlin, 1895, 14. Auflage, 524

- 113) Jagels, M. A., Daffern, P. J., Hugli, T. E.
C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion.
Immunopharmacology 46 (2000) 209 – 222
- 114) Jill Mackarell, A., Russel, K.J., Brady, C.S., FitzGerald, M.X., O'Connor, C.M.
Interleukin-8 and leukotriene-B(4), but not formylmethionyl leucylphenylalanine, stimulate CD18-independent migration of neutrophils across human pulmonary endothelial cells in vitro.
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 23 (2000) 154 – 161
- 115) Joseph, M., Gounni, A. S., Kusnierz, J. P., Vorng, H., Sarfati, M., Kinet, J. P., Tonnel, A. B., Capron, A., Capron, M.
Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors.
Eur. J. Immunol. 27 (1997) 2212 – 2218
- 116) Jung, T.T.K., Juhn, S.K., Stewart, R., Hwang, D.
Prostaglandins, leukotrienes, and other arachidonic acid metabolites in nasal polyps and nasal mucosa.
Laryngoscope 97 (1987) 184 – 189
- 117) Kalinski, P., Hilkens, C.M.U., Snijders, A., Snijders, A., Snijdewint, F.G.M., Kapsenberg, M.L.
IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E₂, promote type 2 cytokine production in maturing human T helper cells.
J. Immunol. 159 (1995) 28 – 35
- 118) Kapsenberg, M.L., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A., Kaliński, P.
The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy.
Clin. Exp. Allergy 29 (1999) 33 – 36

- 119) Karasawa, K., Qiu, X., Lee, T.-c.
Purification and characterization from rat kidney membranes of a novel platelet-activating factor (PAF)-dependent transacetylase that catalyses the hydrolysis of PAF, formation of PAF analogs, and C₂-ceramide.
J. Biol. Chem. 274 (1999) 8655 – 8661
- 120) Kawikova, I., Barnes, P. J., Takahashi, T., Tadjkarimi, S., Yacoub, M. H., Belvisi, M. G.
8-epi-PGF₂ alpha, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airway in vitro.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 153 (1996) 590 – 596
- 121) Kinet, J.-P.
The high affinity IgE receptor (FcεRI): From physiology to pathology.
Annu. Rev. Immunol. 17 (1999) 931 – 972
- 122) Knani, J., Campbell, A., Enander, I., Peterson, C.G.B., Michel, F.-B. Bousquet, J.
Indirect evidence of nasal inflammation assessed by titration of inflammatory mediators and enumeration of cells in nasal secretions of patients with chronic rhinitis.
J. Allergy Clin. Immunol. 90 (1992) 880 – 889
- 123) 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
- 124) Koro, O., Furutani, K., Hide, M., Yamada, S., Yamamoto, S.
Chemical mediators in atopic dermatitis: Involvement of leukotriene B₄ released by a type I allergic reaction in the pathogenesis of atopic dermatitis.
J. Allergy Clin. Immunol. 103 (1999) 663 – 670

- 125) Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S.-I., Lao, A.-N., Fujimoto, Y., Tatsuno, T.
Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 792 (1984) 92 – 97
- 126) Kowalski, M.L., Grzegorczyk, J., Sliwiniska-Kowalska, M., Wojciechowska, B., Rozniecka, M., Rozniecka, J.
Neutrophilic chemotactic activity (NCA) in nasal secretion from atopic and nonatopic subjects.
Allergy 48 (1993) 409 – 414
- 127) Krämer, U., Behrendt, H., Dolgner, R., Willer, H., Schlipköter, H.-W.
Impact of SO₂ 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
- 128) 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
- 129) 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
- 130) Lacal, P., Pulido, R., Sanchez-Madrid F., Cabanas, C., Mollinedo, F.
Intracellular localization of a leukocyte adhesion glycoprotein family in the tertiary granules of human neutrophils.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 154 (1988) 641 – 647

- 131) Laitinen, L.A., Laitinen, A., Haahtela, T., Vilkkka, V., Spur, B.W., Lee, T.H.
Leukotriene E₄ and granulocytic infiltration into asthmatic airways.
Lancet 341 (1993) 989 – 990
- 132) Lam, S., Chan, H., LeRiche, J.C., Chan-Yeung, M., Salari, H.
Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma.
J. Allergy Clin. Immunol. 81 (1988) 711 – 717
- 133) Lamblin, P., Gosset, P., Tillie Leblond, I., Saulnier, F., Marquette, C. H.,
Wallaert, B., Tonnel, A. B.
Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus.
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157 (1998) 394 – 402
- 134) Lawrence, M. B., Springer, T. A.
Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and
prerequisite for adhesion through integrins.
Cell 66 (1991) 859 – 873
- 135) Lebovitz, H. E.
Insulin allergy and insulin resistance.
Curr. Ther. Endocrinol. Metab. 6 (1997) 500 – 504
- 136) Leclercq, G., Plum, J.
Expression and function of Fc receptors in the thymus.
Crit. Rev. Immunol. 15 (1995) 215 – 233
- 137) 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
- 138) Löfdahl, C.G., Reiss, T.F., Leff, J.A., Israel, E., Noonan, M.J., Finn, A.F.,
Seidenberg, B.C., Capizzi, T, Kundu, S., Godard, P.
Randomised placebo-controlled trial of effect of a leukotriene receptor
antagonist, montelukast, on tapering inhaled corticosteroids in asthmatic
patients.
BMJ 319 (1999) 87 – 90

- 139) Lynch, J.M., Lotner, G. Z., Betz, S.J., Henson, P.M.
The release of platelet-activating factor by stimulated rabbit neutrophils.
J. Immunol. 123 (1979) 1219 – 1226
- 140) Lynch, J.M., Worthen, G.S., Henson, P.M.
Platelet-activating factor.
In: “Development of Anti-asthmatic Drugs“ Buckle, D.R., Smith, H. (Eds.)
Butterworths, London, 1984, 73 – 88
- 141) Mackay, J. A. Sass-Kuhn, S., Moqbel, R., Walsh, G. M., Kay, A. B.
The requirements for transferrin-dependent adherence of human
granulocytes to pollen grains.
Allergy 41 (1986) 169 – 178
- 142) Mantovani, B.
Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by
polymorphonuclear leukocytes.
J. Immunol. 115/1 (1975) 15 – 17
- 143) Marom, Z., Shelhamer, J.H., Bach, M.K., Morton, D.R., Kaliner, M.
Slow-reacting substances, leukotrienes C₄ and D₄ increase the release of
mucos from human airway in vitro.
Am. Rev. Respir. Dis. 126 (1982) 449 – 451
- 144) Marsh, D.G., Berlin, L., Bruce, C.A., Lichtenstein, L.M., Hussain, R.
Rapidly released allergens from short ragweed pollen. I. Kinetics of release
of known allergens in relation to biologic activity.
J. Allergy Clin. Immunol. 67 (1981) 206 – 216
- 145) Matsui, K., Ujita, C., Fujimoto, S.-h., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V.,
Kajiwara, T., Feussner, I.
Fatty acid 9- and 13-hydroperoxide lyases from cucumber.
FEBS Letters 481 (2000) 183 - 188

- 146) Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takahashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto, Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Yoshida, N., Kimura, K., Mizoguchi, A., Honda, Y., Nagai, H., Narumiya, S.
Prostaglandin D₂ as a mediator of allergic asthma.
Science 287 (2000) 2013 – 2017
- 147) May, C.D.
The ancestry of allergy: Being an account of the original experimental induction of hypersensitivity recognizing the contribution of Paul Portier. J. Allergy Clin. Immunol. 75 (1985) 485 – 495
- 148) Miadonna, A., Milazzo, N., Gibelli, S., Salmaso, C., Lorini, M., Tedeschi, A.
Nasal response to a single antigen challenge in patients with allergic rhinitis – inflammatory cell recruitment persists up to 48 hours.
Clin. Exp. Allergy 29 (1999) 941 – 949
- 149) McMillian, R.M., Foster, S.J.
Leukotriene B₄ and inflammatory disease.
Agents Actions 24 (1988) 114 – 119
- 150) Mencia-Huerta, J.M., Lewis, R.A., Razin, E., Austen, K.F.
Antigen-initiated release of platelet-activating factor (PAF-acether) from mouse bone marrow-derived mast cells sensitized with monoclonal IgE.
J. Immunol. 131 (1983) 2958 – 2964
- 151) Mencia-Huerta, J. M., Dugas, B., Boichot, E., Petit-Frere, C., Paul-Eugene, N., Lagente, V., Capron, M., Liu, F. T., Braquet, P.
Pharmacological modulation of the antigen-induced expression of the low-affinity IgE receptor (Fc epsilon RII/CD23) on rat alveolar macrophages.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol 94 (1991) 295 – 298
- 152) Mensing, H., Czarnetzki, B.M.
Leukotriene B₄ induces in vitro fibroblast chemotaxis.
J. Invest. Dermatol. 82 (1984) 9 – 12

- 153) Miller, M. E.
Metchnikoff revisited.
J. Pediatr. 89 (1976) 171 – 172
- 154) Mita, H., Yui, Y., Taniguchi, N., Yasueda, H., Shida, T.
Increased activity of 5-lipoxygenase in polymorphonuclear leukocytes from
asthmatic patients.
Life Sci. 37 (1985) 907 – 914
- 155) Morris, H.R., Piper, P.J., Taylor, G.W., Tippins, J.R.
The role of arachidonate lipoxygenase in the release of SRS-A from guinea
pig chopped lung.
Prostaglandins 19/3 (1980) 371 – 383
- 156) Morrow, J.D., Minton, T.A., Roberts, L.J.
The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the
vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/
endoperoxide receptor antagonist.
Prostaglandins 44 (1992) 155 – 163
- 157) Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, J.M., Lynch, S.M., Shyr,
Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., Roberts, W.L.
Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanol) in
smokers.
N. Engl. J. Med. 332 (1995) 1198 – 1203
- 158) Murphy, R.C.
Leukotrien C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cell.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 76/9 (1979) 4275 – 4279
- 159) Mutius, E. v., Fritsch, C., Weiland, S. K.
Prevalance of asthma and allergic disorders among children in united
Germany: A descriptive comparison.
Brit. Med. J. 305 (1992) 1395 – 1399

- 160) Naclerio, R.M., Meier, H.L., Kagey-Sobotka, A., Adkinson, N.F.Jr., Norman, P.S., Lichtenstein, L.M.
Mediator release after nasal airway challenge with allergen.
Am. Rev. Respir. Dis. 128 (1983) 597 – 602
- 161) Naclerio, R.M.
The pathophysiology of allergic rhinitis: impact of therapeutic intervention.
J. Allergy Clin. Immunol. 82 (1988) 927 – 934
- 162) Naclerio, R.
Clinical manifestations of the release of histamine and other inflammatory mediators.
J. Allergy Clin. Immunol. 103 (1999) S382 – S385
- 163) Nagy, L., Lee, T.H., Goetzl, E.J., Pickett, W.C., Kay, A.B.
Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products.
Clin. Exp. Immunol. 47 (1982) 541 – 547
- 164) Nakamura, T., Kloetzer, W. S., Brams, P., Hariharan, K., Chamat, S., Cao, X., LaBarre, J., Chinn, P. C., Morena, R. A., Shestowsky, W. S., Li, Y.-P., Chen, A., Reff, M. E.
In vitro IgE inhibition in B cells by anti-CD23 monoclonal antibodies is functionally dependent on the immunoglobulin Fc domain.
Int J Immunopharmacol 22 (2000) 131 – 141
- 165) Narumiya, S., Salmon, J.A., Cottee, F.H., Weatherley, B.C., Flower, R.J.
Arachidonic acid 15-lipoxygenase from rabbit peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Partial purification and properties.
J. Biol. Chem. 25 (1981) 9583 – 9592

- 166) Nohgawa, M., Sasada, M., Maeda, A., Asagoe, K., Harakawa, N., Takano, K., Yamamoto, K., Okuma, M.
Leukotrien B₄-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration.
J. Leukoc Biol 62 (1997) 203 – 209
- 167) O'Driscoll, B.R., Cromwell, O., Kay, A.B.
Sputum leukotriene in obstructive airway disease.
Clin. Exp. Immunol. 55 (1984) 397 – 404
- 168) Örning, L., Hammarström, S., Samuelsson, B.
Leukotrien D: a slow reacting substance from rat basophilic leukemia cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 76 (1980) 2014 – 2017
- 169) Okano-Mitani, H., Ikai, K., Imamura, S.
Leukotriene A₄ hydrolase in peripheral leukocytes of patients with atopic dermatitis.
Arch. Dermatol. Res. 288 (1996) 168 – 172
- 170) Okazki, T., Reismann, R., Arbesman, C.
Prostaglandin E in the secretions of allergic rhinitis.
Prostaglandins 13 (1977) 681 – 690
- 171) Palmblad, J., Malmsten, C.L., Üden, A.M., Radmark, O., Engstedt, L., Samuelsson, B.
Leukotriene B₄ is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence.
Blood 58 (1981) 658 – 661
- 172) Palmblad, J., Gyllenhammar, H., Lindgren, J.A., Malmsten, C.L.
Effects of leukotrienes and f-Met-Leu-Phe on oxidative metabolism of neutrophils and eosinophils.
J. Immunol. (1984) 3041 – 3045

- 173) Parker, C.W.
Leukotrienes and prostaglandins in the immune system.
Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 16 (1986) 113 – 134
- 174) Payan, D.G., Goetzi, E.J.
Specific suppression of human T lymphocyte function by leukotriene B₄.
J. Immunol. 131 (1983) 551 – 553
- 175) Pelikan, Z.
The changes in the nasal secretion of eosinophils during the immediate nasal response to allergen challenge.
J. Allergy Clin. Immunol., 72 (1983) 657 – 662
- 176) Peters, S.P., Kagey-Sobotka A., MacGlashan, D.W.Jr., Siegel, M.I., Lichtenstein, L.M.
The modulation of human basophil histamine release by products of the lipoxygenase pathway.
J. Immunol. 129/2 (1982) 797 – 803
- 177) Pipkorn, U., Proud, D., Lichtenstein, L.M., Kagey-Sobotka A., Norman, P. S., Naclerio, R. M.
Topical steroid pretreatment inhibits mediator release in vivo.
N. Engl. J. Med. 316 (1987) 1506 – 1510
- 178) Pipkorn, U., Karlsson, G., Lennart, E.
The cellular response of the human allergic mucosa to natural allergen exposure.
J. Allergy Clin. Immunol. 82 (1988) 1046 – 1054
- 179) Pirquet, C.v.
Allergie.
Munch Med Wschr 30 (1906) 1457 – 1458

- 180) Pizzichini E, Leff JA, Reiss TF, Hendeles L, Boulet LP, Wie LX, Efthimiadis AE, Zhang J, Hargreave FE.
Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial.
Eur. Respir. J. 14 (1999) 12 – 18
- 181) Portier, P., Richet, C.
Nouveaux faits d'anaphylaxie, ou sensibilisation aux venins par doses réitérées.
R. Soc. Biol. 54 (1902) 548 – 551
- 182) Poulsen, L., Jacobi, H., Ulfgren, A., Bindslev-Jensen, C., Reimert, C., Jones, I., Elfman, L., Mygind, N.
Neutrophils in allergic rhinitis: elevated level of IL-8 and MPO (myeloperoxidase) in nasal lavage fluid after allergen challenges.
J. Allergy Clin. Immunol. 93 (1994) 215
- 183) Prausnitz, C., Küstner, H.
Studien über die Überempfindlichkeit.
Zbl. Bakt. I Orig. 86 (1921) 160 – 169
- 184) Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M.
Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-phosphocholine) when stimulated with thrombin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 81 (1984) 3534 – 3538
- 185) Ra, C., Jouvin, M. H., Blank, U., Kinet, J. P.
A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit.
Nature 341 (1989) 752 – 754

- 186) Reale, M., Barbacane, R.C., Frydas, S., Anogianakis, G., Trakatellis, A., Dimitriadou, D., Vacalis, D., Placido, F.C., De Fazio, P., Porreca, E., Di Febbo, C., Conti, P.
Human recombinant interleukin-1 beta induces thromboxane A₂ release in polymorphonuclear leukocytes, macrophages and platelets: effect of IL-1 receptor antagonist.
Mol. Cell. Biochem. 159 (1996) 163 – 168
- 187) Reddanna, P., Whelan, J., Reddy, P.S., Reddy, C.C.
Isolation and characterization of 5-lipoxygenase from tulip bulbs.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 (1985) 1348 – 1351
- 188) Rest, R. F., Cooney, M. H., Spitznagel, J. K.
Subcellular distribution of glycosidases in human polymorphonuclear leucocytes.
Biochem. J. 174 (1978) 53 – 59
- 189) Ribeiro, R.A., Souza-Filho, M.V.P., Souza, M.H.L.P., Oliveira, S.H.P., Costa, C.H.S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H.
Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg.
Int. Arch. Allergy. Immunol. 112 (1997) 27 – 35
- 190) Richet, C.
Conférence Nobel sur l'anaphylaxie.
In : "Les Prix Nobel." Norstedt, Söner (Eds.), Stockholm, Bibliotheca Regia Monacensis, 1914, 1 – 20
- 191) Rieber, E. P., Rank, G., Kohler, I., Krauss, S.
Membrane expression of Fc epsilon RII/CD23 and release of soluble CD23 by follicular dendritic cells.
Adv. Exp. Med. Biol. 329 (1993) 393 – 398

- 192) Ring, J., Messmer, K.
Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes.
Lancet (1977) 466 – 469
- 193) Ring, J.
Klinik und Einteilung allergischer Erkrankungen. Geschichtliche Entwicklung. In: "Angewandte Allergologie", Ring, J. (Hrsg.), MMW Taschenbuch, München, 1995, 2. Auflage, 13
- 194) Ring, J.
Pathomechanismen allergischer Reaktionen. IgE und Atopie.
In: "Angewandte Allergologie", Ring, J. (Hrsg.), MMW Taschenbuch, München, 1995, 2. Auflage, 17
- 195) Ring, J.
Pathomechanismen allergischer Reaktionen. IgE und Atopie.
In: "Angewandte Allergologie", Ring, J. (Hrsg.), MMW Taschenbuch, München, 1995, 2. Auflage, 27
- 196) Ring, J., Kraemer, U., Schafer, T., Behrendt, H.
Why are allergies increasing?
Current Opinion in Immunology 13 (2001) 701 – 708
- 197) Roitt, I. Typ V – Stimulatory hypersensitivity.
In: "Roitt's Essential Immunology", Roitt, I. (Ed.), Blackwell Science, 1997, ninth edition, 348 – 349
- 198) Ruzicka, T., Aubock, J.
Arachidonic acid metabolism in guinea pig Langerhans cells: studies on cyclooxygenase and lipoxygenase pathways.
Adv. Prostaglandin. Thromboxane Leukot. Res. 17B (1987) 657 – 663

- 199) Sakurada, T., Abe, M., Kodani, M., Sakata, N., Katsuragi, T.
Synergistic effects of pranlukast and leukotriene B4 receptor antagonist on antigen-induced pulmonary reaction.
Eur. J. Pharmacol. 370 (1999) 153 – 159
- 200) Sampson, A.P., Thomas, R.U., Costello, J.F., Piper, P.J.
Enhanced leukotriene synthesis in leukocytes of atopic and asthmatic subjects.
Br. J. Clin. Pharmacol. 33 (1992) 423 – 430
- 201) Samuelsson, B., Borgeat, P., Hammarström, S., Murphy, R.C.
Introduction of a nomenclature: Leukotrienes.
Prostaglandins 17 (1979) 785 – 787
- 202) Schäppi, G.F., Monn, C., Wüthrich, B., Wanner, H.U.
Direct determination of allergens in ambient aerosols: Methodological aspects.
Int. Arch. Allergy Immunol. 110 (1996) 364 – 370
- 203) 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
- 204) Schopf, R.
Immunglobulin-Klassen und Subklassen.
In: Allergologie systematisch, Schopf, R. (Hrsg.), UNI-MED Verlag, Bremen,
1997, 1. Auflage, 49 – 50
- 205) Schubert, R., Wagner, G.
Botanisches Wörterbuch
UTB-Verlag, Stuttgart (1993) 11. Auflage, 397

- 206) Schuil, P.J., Ten Berge, M., Van Geldern, J.M.E., Graamans, K., Huizin, E.H. Effects of Prostaglandins D₂ and E₂ on ciliary beat frequency of human upper respiratory cilia in vitro.
Acta Otolaryngol. 115 (1995) 438 – 442
- 207) Schultz, J., Corlin, R., Oddi, F., Kaminker, K., Jones W. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. 3. Isolation of the peroxidase granule.
Arch. Biochem. Biophys. 111 (1965) 73 – 79
- 208) Seifert, R., Hoer, A., Offermanns, S., Buschauer, A., Schunack, W. Histamine increases cytosolic Ca²⁺ in dibutyryl-cAMP-differentiated HL-60 cells via H₁ receptors and is an incomplete secretagogue.
Mol. Pharmacol. 42 (1992) 227 – 234
- 209) Seifert R., Hoer, A., Schwaner, I., Buschauer, A. Histamine increases cytosolic Ca²⁺ in HL-60 promyelocytes predominantly via H₂ receptors with an unique agonist/antagonist profile and induces functional differentiation.
Mol. Pharmacol. 42 (1992) 235 – 241
- 210) Shapiro, A.C., Wu, D., Meydani, S.N. Eicosanoids derived from arachidonic and eicosapentaenoic acids inhibit T cell proliferative response.
Prostaglandins 45 (1993) 229 – 240
- 211) Shaw, G.
The chemistry of sporopollenin
In: "Sporopollenin",
Brooks, J.: Grant, P. R.; Muir, M.; van Gijssel, P., Shaw, G. (Hrsg.),
Academic Press, London, New York (1971) 305 – 350
- 212) Shaw, R.J., Fitzharris, P., Cromwell, O., Wardlaw, A.J., Kay, A.B. Allergen-induced release of sulphidopeptide leukotriene (SRS-A) and LTB₄ in allergic rhinitis.
Allergy 40 (1985) 1 – 6

- 213) Shen, T.Y.
Perspectives in nonsteroidal anti-inflammatory agents.
Angew. Chem. Int. Ed. 11 (1972) 460 – 472
- 214) Shen, T.Y., Winter, C.A.
Chemical and biological studies on indomethacin, sulindac and their
analogs. Adv Drug Res 12 (1977) 90 – 245
- 215) Shimizu T, Honda Z, Miki I, Seyama Y, Izumi T, Radmark O, Samuelsson
B. Potato arachidonate 5-lipoxygenase: purification, characterization, and
preparation of 5(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid.
Methods Enzymol. 187 (1990) 296 – 306
- 216) Shou, C.
Allergens in rhinitis: B- and T-cell epitopes of allergen molecules.
Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 10 – 14
- 217) Showell, H.J., Pettipher, E.R., Cheng, J.B., Breslow, R, Conklyn, M.J.,
Farrell, C.A., Hingorani, G.P., Salter, E.D., Hackman, B.C., Wimberly, D.J.,
Doherty, N.S., Melvin, L.S., Reiter, L.A., Biggers, M.S., Koch, K. The in vitro
and in vivo pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B₄
receptor antagonist CP-105696
J. Pharmacol. Exp. Ther. 273 (1995) 176 – 184
- 218) Stanley, R. G., Linsken, H. F.
Pollen: Biologie, Biochemie, Gewinnung und Verwendung.
Urs Freund Verlag, Greifenberg (1985) 1 – 34, 188 – 205
- 219) Stewart, A. G., Dusting, G. J.
Characterization of receptors for platelet-activating factor on platelets,
polymorphonuclear leukocytes and makrophages.
Br. J. Pharmacol 94 (1988) 1225 – 1233
- 220) SRU (Rat von Sachverständigen für Umweltfragen)
Umwelt und Gesundheit, Risiken richtig einschätzen. Sondergutachten.
Verlag Metzler Poeschel, Stuttgart (1998)

- 221) Sugimoto, M., Sugiyama, S., Yanagita, N., Ozawa, T.
Laser high performance liquid chromatography determination of
prostaglandins in nasal lavage fluid in allergic rhinitis.
Clin. Exp. Allergy 24 (1994) 324 – 329
- 222) Sun, F.F., McGuire, J.C., Wallach, D.P., Brown, V.R. Advances on the
property and inhibition of human platelet arachidonic acid 12-lipoxygenase.
Adv. Prostaglandin Thromboxane Res. 6 (1980) 111 – 113
- 223) Sun, Y., Qian, H., Xu, X.D., Han, Y., Yen, L.F., Sun, D.Y.
Integrin-like proteins in the pollen tube: detection, localization and function
Plant Cell Physiol. 41 (2000) 1136 – 1142
- 224) 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
- 225) Sutbeyaz, Y., Yakan, B, Ozdemir, H., Karasan, M., Doner, F.,
Kufrevioglu, I.
Effect of SC-41930, a potent selective leukotriene B₄ receptor antagonist, in
the guinea pig model of middle ear inflammation.
Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 105 (1996) 476 – 480
- 226) Sveen, K., Hofstad, T.
Use of performed cavities in rabbits for the quantification of leukocyte
chemotaxis cause by bacterial lipopolysaccharides.
Acta Path. Microbiol. Scand. 84 (1976) 252 – 258
- 227) Takayama, H., Sato, T., Tanizaki, Y., Kimura, I.
Cytological studies on bronchoalveolar lavage fluid in bronchial asthma.
In: Crystal, R. Reynolds, H. Reynolds (eds.): Proceedings of Congress on
Bronchoalveolar Lavage, Maryland, USA (Abs., in press)

- 228) Tauber, A.I., Brettler, D.B., Kennington, E.A., Blumberg, P.M.
Relation of human neutrophil phorbol ester receptor occupancy and
NADPH-oxidase activity.
Blood 60/2 (1982) 333 – 339
- 229) Teramoto, S., Shu, C.Y., Ouchi, Y., Fukuchi, Y.
Increased spontaneous production and generation of superoxide anion by
blood neutrophils in patients with asthma.
J. Asthma 33 (1996) 149 – 155
- 230) Thorlacius, H., Lindbom, L., Hedqvist, P, Raud, J.
Microvascular actions of histamine: synergism with leukotriene B₄ and role
in allergic leucocyte recruitment.
Clin. Exp. Allergy 27 (1997) 445 – 451
- 231) Tiku, K., Tiku, M.L., Skosey, J.L.
Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils.
J. Immunol. 136/10 (1986) 3677 – 3685
- 232) Tinghino, R., Twardosz, A., Barletta, B., Puggioni, E. M., Iacovacci, P.,
Butteroni, C., Afferni, C., Mari, A., Hayek, B., Di Felice, G., Focke, M.,
Westritschnig, K., Valenta, R., Pini, C.
Molecular, structural, and immunologic relationship between different
families of recombinant calcium-binding pollen allergens.
Journal of Allergy and Clinical Immunology 109 (2002) 314 – 320
- 233) Traidl-Hoffmann*, C., Kasche*, A., Jakob, T., Huger, M., Plötz, S.,
Feussner, I., Ring, J., Behrendt, H.
Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of
polymorphonuclear granulocytes.
J. Allergy Clin. Immunol (2002) in press

*Both authors contributed equally to this work

- 234) Truong, M.J., Gruart, V., Kusnierz, J.P., Papin, J.P., Loiseau, S., Capron, A., Capron, M.
Human neutrophils express Immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/εBP) of the S-type lectin family: Role in IgE-dependent activation.
J. Exp. Med. 177 (1993) 243 – 248
- 235) Twardosz, A., Hayek, B., Seiberle, S., Vangelista, L., Elfman, L., Gronlu, H., Kraft, D., Valenta, R.
Molecular characterization, expression in *Escherichia coli*, and epitope analysis of a two EF-hand calcium-binding birch pollen allergen, Bet v 4.
Biochemical and Biophysical Research Communication 239 (1997) 197 – 204
- 236) Van de Velde, M. J., Engels, F., Henricks, P. A. J., Bloemen, P. G. M., Nijkamp, F. P.
The linolenic acid metabolite 13-HODE modulates degranulation of human polymorphonuclear leukocytes.
FEBS Letters 369 (1995) 301 – 304
- 237) Van Eeden, S.F., Hogg, J.C.
The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking.
Eur. Respir. J. 15 (2000) 915 – 921
- 238) Vargaftig, B.B., Chignard, M., Lefort, J., Benveniste, J.
Platelet-tissue interaction: role of platelet-activating factor (PAF-acether).
Agents Actions 10/6 (1980) 502 – 506
- 239) Venge, P., Hendrikson, J., Dahl, R., Hakansson, L. (1990)
Exercise induced asthma and the generation of neutrophil chemotactic activity.
Allergy Clin. Immunol. 85 (1990) 498 – 504
- 240) Vieira, P.L., de Jong, E.C., Wierenga, E.A., Kapsenberg, M.L., Kaliński, P.
Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction
J. Immunol. 196 (2000) 4507 – 4512

- 241) Vignola, A.M., Chanez, P., Campbell, A.M., Bousquet, J., Michel, F.B., Godard, P.
Functional and phenotypic characteristics of bronchial epithelial cells obtained by brushing from asthmatic and normal subjects.
Allergy 17 (1993) 32-38
- 242) Wardlaw, A.J., Hay, H., Cromwell, O., Collins, J.V.
Leukotrienes, LTC₄ and LTB₄, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases.
J. Allergy Clin. Immunol. 84 (1989) 19 – 26
- 243) Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C., Feussner, I.
Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves- preferential induction of the reductase pathway by salicylate.
FEBS Letters 464 (1999) 133 – 137
- 244) WHO/IUIS (Allergen Nomenclature Subcommittee)
Allergen nomenclatur.
Bull. World Health Org. 72 (1994) 797 – 806
- 245) Wichmann, H. E.
Environment, life-style and allergy: The German answer.
Allergo J. 4 (1995) 315 – 316
- 246) Wüthrich, B.
Epidemiology of the allergic diseases: Are they really on the increase?
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 90 (1989) 3 – 10
- 247) Yamane, H., Sugimoto, Y., Tanaka, S., Ichikawa, A.
Prostaglandin E2 receptors, EP2 and EP4, differently modulate TNF- α and IL-6 production induced by lipopolysaccharide in mouse peritoneal neutrophils.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 278 (2000) 224 – 228

- 248) Yamaoka, K. A., Arock, M., Issaly, F., Dugas, N., LeGoff, L., Kolb, J. P.
Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces FcεRII/CD23
expression on normal human polymorphonuclear neutrophils.
Int. Immunol. 4 (1996) 479 – 490
- 249) Zahler, S., Becker, B. F.
Indirect enhancement of neutrophil activity and adhesion to cultured human
umbilical vein endothelial cells by isoprostanes (iPF2α-III and iPE2-III)
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 57 (1999) 319 – 331
- 250) Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C.
MHC-restricted cytotoxic Z cells: Studies on the biological role of
polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction-
specificity, function and responsiveness. Advanc. Immunol. 27 (1979) 51 –
177
- 251) Zocca, E., Fabbri, L.M., Boschetto, P., Plebani, M., Masiero, M., Milani,
G.F., Pivrotto, F., Mapp, C.E.
Leukotriene B4 and late asthmatic reactions induced by toluene
diisocyanate.
J. Appl. Physiol. 68 (1990) 1576 – 1580

8. Danksagung

Danken möchte ich Frau Professor Dr. Heidrun 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 Professor Dr. Per Venge vom Universitätskrankenhaus in Uppsala/Schweden für die Messung des Humanen Neutrophilen Lipokalins und Herrn Privatdozent Dr. Ivo Feussner vom Institut für Pflanzengenetik in Gatersleben für die HPLC-Analysen der Birkenpollen danken.

Frau Dr. Krämer vom Medizinischen Institut für Umwelthygiene in Düsseldorf danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für die sehr gute Zusammenarbeit möchte ich Frau Susanne Pohl, Abteilung für experimentelle Dermatologie und Allergologie an der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg, Cordula Ebner von Eschenbach, Zentrum Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München und Johanna Grosch von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein danken.

Meinen Eltern danke ich besonders für die wissenschaftliche und seelische Unterstützung.

9. Lebenslauf

Geboren als Tochter von Volker Kasche, Universitäts-Professor für Biochtechnologie, und Karin Århammar-Kasche, Diplom-Psychologin, am 20.10.1971 in Uppsala/Schweden. Schulausbildung am Schulzentrum an der Ronzelenstraße und am Hermann-Böse-Gymnasium in Bremen.

Nach dem Medizinstudium in Hamburg, Uppsala/Schweden und Philadelphia/USA 1999 Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Zentrum Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München.

10. Anhang

10.1 Daten zu Abbildungen und Tabellen

Adhärenz der PMN an *Betula alba*: Daten zu *Tab. 4.1.1-1a*

Klassifikation^① der Adhärenz der PMN an Birkenpollen^②

PMN von nicht-rauchenden Birkenpollen-Allergikern

RAST (Birke) ≥ 3 , Inkubationszeit: 30 Minuten

Proband	Versuchs-Nr.	0	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
TI	63	38	38	0	21	2	1	0
JA	64	33	25	9	14	11	4	4
CD	68	36	16	3	33	6	6	0
UP	70	40	24	1	26	2	7	0
WK	72	15	10	4	23	10	25	13
KBr	83	31	27	12	11	8	4	7
BV	84	11	13	4	28	14	11	19
MS	85	16	11	13	9	27	2	22
AB	90	5	11	5	31	8	25	15
IW	91	31	30	3	31	1	4	0
TD	92	43	29	6	14	4	3	1
NJ	93	0	0	1	8	3	7	81

① Klassifikation

- 0 kein PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
- I 1 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
- II 2 bzw. 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
- III ≥ 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*

- a ohne führende Lamelle
- b mit führender Lamelle

② Es wurden je Proband 100 Pollenkörner ausgezählt.

Klassifikation^① der Adhärenz der PMN an Birkenpollen^②: Daten zu *Tab. 4.1.1-1a*

PMN von nicht-rauchenden Nicht-Allergikern
 RAST (Birke) ≥ 3 , Inkubationszeit: 30 Minuten

Proband	Versuchs-Nr.	0	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
KH	66	6	11	13	13	27	2	28
Ako	67	22	14	10	30	14	6	4
JFI	78	13	27	1	43	2	12	2
CK	79	31	19	14	11	22	3	0
UA	81	31	27	5	22	7	4	4
Khe	86	14	24	5	39	5	10	3
AV	88	74	22	2	2	0	0	0
SG	89	3	15	9	34	17	10	12

① Klassifikation

- 0 kein PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
 - I 1 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
 - II 2 bzw. 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
 - III ≥ 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
-
- a ohne führende Lamelle
 - b mit führender Lamelle

② Es wurden je Proband 100 Pollenkörner ausgezählt.

Klassifikation^① der Adhärenz der PMN an Birkenpollen^②: Daten zu *Tab. 4.1.1-1b*

PMN von nicht-rauchenden Birkenpollen-Allergikern

RAST (Birke) ≥ 3 , Inkubationszeit: 2 Stunden

Proband	Versuchs-Nr.	0	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
TI	63	35	10	10	19	7	19	0
JA	64	26	16	5	22	12	6	13
CD	68	38	10	3	0	10	0	39
UP	70	13	14	2	35	4	31	1
WK	72	22	17	4	17	6	29	5
KBr	83	4	3	3	0	13	2	75
BV	84	26	17	21	1	22	2	11
MS	85	13	6	3	15	17	1	45
AB	90	7	13	3	13	22	15	27
IW	91	23	16	14	18	16	6	7
TD	92	7	6	2	10	20	5	50
NJ	93	9	11	3	13	28	16	20

① Klassifikation

- 0 kein PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
 - I 1 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
 - II 2 bzw. 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
 - III ≥ 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
-
- a ohne führende Lamelle
 - b mit führender Lamelle

② Es wurden je Proband 100 Pollenkörner ausgezählt.

Klassifikation^① der Adhärenz der PMN an Birkenpollen^②: Daten zu *Tab. 4.1.1-1b*

PMN von nicht-rauchenden Nicht-Allergikern
 RAST (Birke) ≥ 3 , Inkubationszeit: 2 Stunden

Proband	Versuchs-Nr.	0	Ia	Ib	IIa	IIb	IIIa	IIIb
KH	66	16	25	4	23	23	4	5
Ako	67	28	23	8	19	15	4	3
JFI	78	16	14	2	20	29	8	11
CK	79	17	8	9	17	25	10	14
UA	81	32	22	23	4	19	0	0
Khe	86	23	21	6	29	6	15	0
AV	88	24	25	10	25	5	8	3
SG	89	2	7	1	18	12	25	35

① Klassifikation

- 0 kein PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
- I 1 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
- II 2 bzw. 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*
- III ≥ 3 PMN adhären an 1 Pollenkorn von *Betula alba*

- a ohne führende Lamelle
- b mit führender Lamelle

② Es wurden je Proband 100 Pollenkörner ausgezählt.

Daten zu *Abbildung 4.1.2-1* Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) aus neutrophilen Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) bei Inkubation mit und ohne Birkenpollen ($1 \times 10^5/\text{ml}$). Zwei Stunden Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad

MPO [$\mu\text{g/l}$]

Birkenpollen-Allergiker	PMN ohne Birkenpollen	PMN + Birkenpollen
M. H.	4	8,4
J. P.	13,7	22,8
D. O.	8,6	24,8
H. C.	19,2	59,3
P. K.	21,9	41,6
Mittelwert	13,5	31,4
Standardabweichung	7,4	19,6

Daten zu *Abbildung 4.1.2-2* Freisetzung von Humanem Neutrophilen Lipokalin (HNL) aus neutrophilen Granulozyten ($1 \times 10^6/\text{ml}$) bei Inkubation mit und ohne Birkenpollen ($1 \times 10^5/\text{ml}$). Zwei Stunden Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad

HNL [$\mu\text{g/l}$]

Birkenpollen-Allergiker	PMN ohne Birkenpollen	PMN + Birkenpollen
H. C.	26,2	56,2
P. K.	1,8	73,3
M. H.	0,2	25,5
K. S.	1,2	42,2
Mittelwert	7,4	49,3
Standardabweichung	12,6	20,3

Tabelle zur *Abbildung 4.1.2-3A und Abb. 4.1.2-4A* Interleukin-8-Freisetzung aus PMN stimuliert mit Birkenpollen. Inkubation von neutrophilen Granulozyten (1×10^6 PMN/ml) von **Birkenpollen-Allergikern (n=6)** mit verschiedenen Pollenkonzentrationen (1×10^4 /ml, 1×10^5 /ml, 1×10^6 /ml). Angegeben sind Mittelwerte aus Doppelansätzen.

IL-8-Konzentration im Überstand [pg/ml]				
Anzahl der Pollen / ml	0	1×10^4	1×10^5	1×10^6
Inkubationszeit: T₀				
64 JA	0	0	0	0
68 CD	0	0	0	0
70 UP	0	0	0	0
72 WK	0	0	0	0
84 BV	0	0	0	0
85 MS	0	0	0	0
Inkubationszeit: 120 Minuten				
64 JA	123	268	44	123
68 CD	44	202	429	169
70 UP	36	0	38	70
72 WK	0	0	0	22
84 BV	0	0	0	0
85 MS	0	0	0	0
Inkubationszeit: 300 Minuten				
64 JA	204	417	640	124
68 CD	50	136	738	142
70 UP	22	0	464	56
72 WK	0	0	208	24
84 BV	0	0	0	0
85 MS	0	0	175	0

Tabelle zur 4.1.2-3B und Abb. 4.1.2-4B Interleukin-8-Freisetzung aus PMN stimuliert mit Birkenpollen. Inkubation von neutrophilen Granulozyten (1×10^6 PMN/ml) von **Kontrollpersonen (n=7)** mit verschiedenen Pollenkonzentrationen (1×10^4 /ml, 1×10^5 /ml, 1×10^6 /ml). Angegeben sind Mittelwerte von Doppelansätzen.

IL-8-Konzentration im Überstand [pg/ml]				
Anzahl der Pollen / ml	0	1×10^4	1×10^5	1×10^6
Inkubationszeit: T₀				
66 KH	0	0	0	0
74 CF	0	0	0	0
78 JFI	0	0	0	0
79 CK	0	0	0	0
81 UA	0	0	0	0
88 AV	0	0	0	0
89 SG	0	0	0	0
Inkubationszeit: 120 Minuten				
66 KH	0	0	34	42
74 CF	0	0	0	0
78 JFI	0	0	0	0
79 CK	0	22	0	0
81 UA	0	0	0	0
88 AV	0	43	0	0
89 SG	28	0	20	0
Inkubationszeit: 300 Minuten				
66 KH	0	42	333	28
74 CF	0	0	273	0
78 JFI	0	0	121	0
79 CK	0	0	360	0
81 UA	0	0	124	0
88 AV	0	0	0	213
89 SG	29	20	204	0

Daten zu *Abbildung 4.1.2-5*

Freisetzung von LTB₄ und PGE₂ aus PMN (1x10⁶/ml) ohne Pollen und mit Birkenpollen (1x10⁶ Pollen/ml)

LTB ₄ [pg/ml]	PMN (1x10 ⁶ /ml) ohne Pollen	PMN (1x10 ⁶ /ml) + Pollen (1x10 ⁶ /ml)
D. O.	0	60
C. D.	0	140
J. A.	40	180
Mittelwert	13	127
Standardabweichung	18,9	49,9

PGE ₂ [pg/ml]	PMN (1x10 ⁶ /ml) ohne Pollen	PMN (1x10 ⁶ /ml) + Pollen (1x10 ⁶ /ml)
D. O.	60	1540
C. D.	20	1320
A. Ko.	20	1760
Mittelwert	33,3	1540
Standardabweichung	18,9	179,6

Daten zu *Abbildung 4.2.1-1*

Kinetik der Gesamtprotein-Freisetzung aus *Betula alba*. Angegeben sind 4-fach-Ansätze mit Doppelbestimmung.

Konzentration: 6,25 mg Pollen/ml
 pH: 7,4
 Temperatur: 37°C
 Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

		Gesamtprotein [$\mu\text{g/ml}$]						
Inkubationszeit [Minuten]		0	1	5	10	30	120	300
		14,37	21,19	25,72	26,82	29,39	35,10	38,41
		13,51	21,26	26,10	27,53	27,36	37,63	37,36
		12,96	18,64	26,83	28,80	30,41	33,87	37,42
		14,94	19,03	25,43	27,91	29,15	34,54	40,62
		10,37	14,62	20,86	21,79	27,19	37,42	35,14
		9,39	13,35	22,38	23,71	27,69	37,72	31,73
		10,12	16,47	22,03	24,58	27,27	34,97	35,16
		10,06	18,07	22,16	24,17	28,16	33,63	33,65
Kontrolle		0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		11,97	17,83	23,94	25,66	28,33	35,61	36,19
SD		2,07	2,68	2,15	2,29	1,11	1,60	2,64
rel. SD		17	15	9	9	4	5	7
CI (95%)		1,43	1,86	1,49	1,59	0,77	1,11	1,83

CI = Konfidenzintervall

Daten zu *Abbildung 4.2.1-2*

Kinetik der Bet v 1-Freisetzung aus *Betula alba*. Angegeben sind 4-fach-Ansätze mit Doppelbestimmung.

Konzentration: 10 mg Pollen/ml
 pH: 7,4
 Temperatur: 37°C
 Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

		Bet v 1 [$\mu\text{g/ml}$]						
Inkubationszeit [Minuten]		0	1	5	10	30	120	300
		0,72	4,52	7,90	8,04	13,36	24,76	21,82
		0,51	-----	9,42	8,84	14,06	27,87	27,00
		0,55	3,10	7,29	7,46	11,29	22,63	27,72
		0,45	4,94	9,09	8,84	12,58	21,78	19,22
Kontrolle		0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		0,56	4,19	8,43	8,29	12,82	24,26	23,94
SD		0,10	0,79	0,87	0,58	1,03	2,35	3,55
rel. SD		18	19	10	7	8	10	15
CI (95%)		0,10	0,77	0,85	0,57	1,01	2,30	3,48

CI = Konfidenzintervall

Daten zu *Tab. 4.2.1-3*

Konzentration: 10 mg Pollen/ml
 pH: 7,4
 Inkubationszeit: 30 Minuten
Puffer: PBS

pH	Gesamtprotein [$\mu\text{g/ml}$]		
	6,0	7,4	9,0
	21,8	33,8	31,3
	21,0	29,7	31,5
	21,7	27,0	33,9
	22,1	29,4	33,6
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	21,6	30,0	32,6
SD	0,5	2,8	1,4

Diese Daten sind veröffentlicht worden in International Archives of Allergy and Immunology [18].

Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

pH	Gesamtprotein [$\mu\text{g/ml}$]		
	6,0	7,4	9,0
	23,89	36,54	35,06
	24,72	34,48	34,86
	26,50	34,50	34,14
	26,78	32,53	34,18
	29,89	33,56	35,52
	30,46	35,82	34,22
	31,62	33,81	35,04
	32,53	33,30	36,64
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	28,30	34,29	34,96
SD	3,04	1,26	0,79

Daten zu *Tab. 4.2.1-3*

Konzentration: 10 mg Pollen/ml
 Temperatur: 37°C
 Inkubationszeit: 30 Minuten
Puffer: PBS

Bet v 1 [$\mu\text{g/ml}$]

pH	6,0	7,4	9,0
	7,0	10,72	8,8
	5,6	11,41	9,0
	5,6	10,78	8,4
	6,8	11,12	8,5
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	6,2	9,3	8,7
SD	0,7	0,9	0,3

Diese Daten sind veröffentlicht worden in International Archives of Allergy and Immunology [18].

Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

Bet v 1 [$\mu\text{g/ml}$]

pH	6,0	7,4	9,0
	11,89	10,72	4,55
	11,73	11,41	4,19
	9,47	10,78	4,47
	10,66	11,12	5,55
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	10,94	11,01	4,69
SD	0,97	0,28	0,52

Daten zu *Abbildung 4.2.1-3*

Konzentration: 6,25 mg Pollen/ml
 pH: 7,4
 Inkubationszeit: 30 Minuten
 Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

Gesamtprotein [$\mu\text{g/ml}$]

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]

	4	20	37
	13,06	19,04	22,95
	12,24	18,85	21,40
	11,33	18,85	20,71
	11,71	18,65	22,09
	12,29	18,50	22,83
	12,11	19,64	23,61
	12,75	18,81	23,60
	14,54	18,90	25,03
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	12,5	18,9	22,8
SD	0,92	0,32	1,28

Bet v 1 [$\mu\text{g/ml}$]

Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]

	4	20	37
	1,52	4,69	10,56
	1,55	6,98	10,72
	1,48	4,79	8,48
	2,02	6,56	11,95
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	1,64	5,76	10,43
SD	0,22	1,03	1,25

Daten zu *Abb. 4.2.2-1*

Kinetik der Freisetzung LTB₄-ähnlichen Substanzen aus *Betula alba*

Konzentration: 10 mg Pollen/ml

pH: 7,4

Temperatur: 37°C

Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

LTB₄-ähnliche Substanzen [pg/ml]

Inkubationszeit

[Minuten]	0	1	5	10	30	120	300
	89	216	304	310	288	360	340
	87	227	323	303	281	400	354
	77	182	262	324	390	354	361
	87	222	269	271	354	272	416
	83	220	441	327	291	333	384
	72	192	392	277	302	306	367
	77	234	408	306	313	325	351
	77	265	306	319	309	300	384
Kontrolle, 1. Versuch	0	30	13	8	25	16	16
Kontrolle, 2. Versuch	0	0	58	12	7	8	10
Mittelwert	81	220	338	305	316	331	370
SD	6	25	67	21	37	40	24
rel. SD	8	12	20	7	12	12	7
CI (95%)	4	30	30	15	26	28	17

CI = Konfidenzintervall

Diese Daten sind veröffentlicht worden in International Archives of Allergy and Immunology [19].

Daten zu *Abb. 4.2.2-1*

Kinetik der Freisetzung PGE₂-ähnlicher Substanz aus *Betula alba*

Konzentration: 10 mg Pollen/ml

pH: 7,4

Temperatur: 37°C

Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

PGE₂-ähnliche Substanzen [pg/ml]

Inkubationszeit

[Minuten]

	0	1	5	10	30	120	300
	672	1361	1652	1843	1909	1908	1989
	618	1364	1708	1874	1731	1950	1884
	568	1083	1703	1875	2113	1721	2023
	605	1244	1765	1489	2061	1868	2082
	588	1174	1855	1688	1649	1764	1930
	587	858	1824	1612	1688	1772	1904
	530	1079	1594	1786	1786	1913	1794
	552	1199	1565	1757	1779	1779	1708
Kontrolle, 1. Versuch	0	0	0	0	0	0	82
Kontrolle, 2. Versuch	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert	590	1170	1708	1741	1840	1834	1914
SD	44	166	103	137	172	85	122
rel. SD	7	14	6	8	9	5	6
CI (95%)	30	115	71	95	119	59	85

CI = Konfidenzintervall

Daten zu *Tab. 4.2.2-1*

Dosisabhängigkeit der Freisetzung von LTB₄-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen.

PH: 7,4
 Temperatur: 37°C
 Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin
 Inkubationszeit: 30 Minuten

Pollen/ml	LTB ₄ -ähnliche Substanzen [pg/ml]						
	0	10000	20000	100000	200000	1000000	2000000
	0	0	0	0	20	140	280
	0	0	0	20	20	120	260
	0	0	0	20	20	100	240
	0	0	0	20	20	160	340
	0	0	0	20	40	80	280
	0	0	0	20	20	100	220
	0	0	0	20	20	40	180
	0	0	0	0	20	60	180
Mittelwert	0	0	0	15	23	100	248
SD	0	0	0	10	7	40	54

Daten zu *Tab. 4.2.2-1*

Dosisabhängigkeit der Freisetzung von PGE₂-ähnlichen Substanzen aus Birkenpollen.

PH: 7,4
 Temperatur: 37°C
 Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin
 Inkubationszeit: 30 Minuten

Pollen/ml	PGE ₂ -ähnliche Substanzen [pg/ml]						
	0	10000	20000	100000	200000	1000000	2000000
	20	20	20	80	140	1260	1980
	20	20	20	60	140	760	1520
	0	0	0	40	100	1060	2180
	20	20	20	80	180	1360	2500
	60	80	100	180	320	1000	1440
	20	20	20	40	60	660	1580
	0	0	20	40	40	420	1280
	20	0	0	10	20	400	940
Mittelwert	23	20	25	68	125	865	1678
SD	20	26	32	50	96	363	509

Daten zu *Abbildung 4.2.2-2*

Freisetzung von LTB₄-ähnlichen Substanzen aus *Betula alba* bei pH 6,0 / 7,4 / 9,0

Konzentration: 10 mg Pollen/ml
Temperatur: 37°C
Inkubationszeit: 30 Minuten
Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

	LTB ₄ -ähnliche Substanzen [pg/ml]		
pH	6,0	7,4	9,0
	115	188	225
	131	143	211
	134	119	204
	130	141	171
	181	103	285
	154	122	307
	149	155	257
	158	177	175
Kontrolle, 1. Versuch	14	14	13
Kontrolle, 2. Versuch	0	0	74
Mittelwert	144	230	367
SD	19	44	74

Daten zu *Abbildung 4.2.2-2*

Freisetzung von LTB₄-ähnlichen Substanzen aus *Betula alba* bei pH 6,0 / 7,4 / 9,0

Konzentration: 10 mg Pollen/ml

Temperatur: 37°C

Inkubationszeit: 30 Minuten

Puffer: PBS

	LTB ₄ -ähnliche Substanzen [pg/ml]		
pH	6,0	7,4	9,0
	144	346	424
	132	342	376
	139	376	374
	144	330	427
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	140	348	400
SD	6	19	29

Diese Daten sind veröffentlicht worden in *International Archives of Allergy and Immunology* [19].

Daten zu *Abbildung 4.2.2-3*

Freisetzung von PGE₂-ähnliche Substanzen aus *Betula alba* bei pH 6,0 / 7,4 / 9,0

Konzentration: 10 mg Pollen/ml
Temperatur: 37°C
Inkubationszeit: 30 Minuten
Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

PGE₂-ähnliche Substanzen [pg/ml]

pH	6,0	7,4	9,0
	818	1283	1630
	811	1262	1603
	771	1330	1605
	859	1304	1542
	842	970	1533
	851	1110	1413
	830	1218	1434
	915	1208	1453
Kontrolle, 1. Versuch	99	0	0
Kontrolle, 2. Versuch	0	0	0
Mittelwert	837	1211	1527
SD	39	111	79

Daten zu *Abbildung 4.2.2-3*

Freisetzung von PGE₂-ähnliche Substanzen aus *Betula alba* bei pH 6,0 / 7,4 / 9,0

Konzentration: 10 mg Pollen/ml

Temperatur: 37°C

Inkubationszeit: 30 Minuten

Puffer: PBS

PGE₂-ähnliche Substanzen [pg/ml]

pH

6,0

7,4

9,0

Kontrolle

Mittelwert

SD

1181	2499	2879
1103	2541	2780
1257	2672	2665
1287	2684	2884
0	0	0

1207

2599

2802

83

93

103

Daten zu *Abbildung 4.2.2-4*

Freisetzung von LTC₄/D₄/E₄-ähnliche Substanzen aus *Betula alba* bei pH 6,0 / 7,4 / 9,0

Konzentration: 10 mg Pollen/ml
Temperatur: 37°C
Inkubationszeit: 30 Minuten
Puffer: PBS

	LTC ₄ /D ₄ /E ₄ -ähnliche Substanz [pg/ml]		
pH	6,0	7,4	9,0
	60	129	131
	54	115	
	65	105	104
	72	106	129
Kontrolle	0	0	0
Mittelwert	63	113	121
SD	8	11	15

Daten zu *Abbildung 4.2.2-5*

Konzentration: 6,25 mg Pollen/ml
 pH: 7,4
 Inkubationszeit: 30 Minuten
 Puffer: RPMI 1640 ohne L-Glutamin

Temperatur [°C]	LTB ₄ -ähnliche Substanzen [pg/ml]		
	4	20	37
	51	109	157
	47	96	152
	50	102	200
	52	129	137
	72	87	159
	67	98	160
	67	109	163
	74	121	169
Kontrolle, 1. Versuch	9	9	8
Kontrolle, 2. Versuch	10	0	46
Mittelwert	60	106	162
SD	10	13	17

Temperatur [°C]	PGE ₂ -ähnliche Substanzen [pg/ml]		
	4	20	37
	402	662	779
	409	642	632
	396	638	689
	400	612	656
	404	592	845
	377	684	857
	487	743	818
	473	482	926
Kontrolle, 1. Versuch	0	0	0
Kontrolle, 2. Versuch	0	0	0
Mittelwert	523	757	954
SD	39	76	106

Diese Daten sind veröffentlicht worden in International Archives of Allergy and Immunology [19].

Daten zu *Abbildung 4.2.3-1*

Konzentration: 10 mg Pollen/ml
 pH: 7,4
 Inkubationszeit: 30 Minuten
 Puffer: PBS

PGE₂-ähnliche Substanzen [pg/ml]

Pollenart	Birke	Lieschgras	Beifuß	Kiefer
	2499	700	2377	609
	2541	675	2288	592
	2672	713	2580	586
	2684	697	2809	711
Kontrolle	0	0	0	0
Mittelwert	2599	696	2514	625
SD	93	15	232	59

LTB₄-ähnliche Substanzen [pg/ml]

Pollenart	Birke	Lieschgras	Beifuß	Kiefer
	346	380	295	29
	342	419	284	31
	376	386	323	28
	330	380	347	31
Kontrolle	0	0	0	0
Mittelwert	348	391	312	30
SD	19	19	28	1

Daten zu *Abbildung 4.2.5-1*

Hemmung der Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten hervorgerufen durch Birkenpollen (3,4 mg/ml) durch Vorinkubation der Zellen mit dem selektiven Leukotrien B₄-Rezeptor-Antagonisten (LY293111, 40 µM). Konzentration des klassischen Chemoattraktans LTB₄ 3,9x10⁻¹⁰ M.

Angegeben ist die Net Migration

	LTB ₄	<i>Betula alba</i>
ohne LY293111	1766	1448
mit LY293111	228	660
ohne LY293111*	1435	1117
mit LY293222*	0	329

* Net Migration: Medium-Migration (331) subtrahiert von der absoluten Migration

Diese Daten sind veröffentlicht worden in Journal of Allergy and Clinical Immunology [233].

Daten zu *Abbildung 4.2.5-2*

Hemmung der Adhärenz der neutrophilen Granulozyten an Birkenpollen durch Vorinkubation der Zellen mit dem selektiven Leukotrien B₄-Rezeptor-Antagonisten (LY293111).

Angegeben ist die Anzahl der Birkenpollen an denen mehr als ein neutrophiler Granulozyt bindet (Angaben in Prozent).

AV	CB	CB
Nicht-Atopiker	Atopiker	Atopiker
ohne LY293111	ohne LY293111	mit LY293111
2%	67%	18%