

Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie,

GSF / TUM

ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt an der

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

der Technischen Universität München

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

**Einfluß von Pollenextrakten auf Effektorfunktionen von neutrophilen  
Granulozyten unter besonderer Berücksichtigung des Effektes von  
Desloratadin**

Michael Huger

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. Priv.-Doz. Dr. C. Traidl-Hoffmann

Die Dissertation wurde am 06.06. 2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.09. 2005 angenommen.

**Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet**

Einige Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden publiziert in:

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 wurde vorgestellt:

**Huger M**, Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Ring J, Behrendt H

Influence of desloratadine on the chemotocitic activity of human polymorphonuclear leukocytes.

XXI. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2002

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

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

Arch Derm Res 294, 15, 2002

Traidl-Hoffmann C, Kasche A, **Huger M**, Plötz S, Feussner I, Ring J, Behrendt H. Immunostimulatory lipid mediators from pollen grains: a new dimension of allergy.

XXI. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2002

Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Jakob T, **Huger M**, Plötz S, Feussner I, Ring J, Behrendt H. Pollen derived lipid mediators act as chemoattractants and activators on neutrophils.

XXIV. Collegium Internationale Allergologicum, Bermuda 2002.

**Huger M**, Traidl-Hoffmann C, Kasche A, Ring J, Behrendt H.

Influence of desloratadine on the chemotactic activity of human polymorphonuclear leukocytes

Allergo Journal 1, 58, 2003.

Einfluß von Pollenextrakten auf Effektorfunktionen von  
neutrophilen Granulozyten unter besonderer  
Berücksichtigung des Effektes von Desloratadin

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1	Allergie: Geschichtliches, Definitionen, Epidemiologie	10
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>13</b>
2.1	Physiologie von neutrophilen Granulozyten	13
2.1.1	Die Rolle der PMN in Entzündungsreaktionen	14
2.1.2	Granula und Rezeptoren der PMN	18
2.1.3	Aktivatoren neutrophiler Granulozyten	20
2.1.4	Rolle der Neutrophilen bei der IgE-vermittelten allergischen Reaktion	26
2.2	Grundlagen der allergischen Reaktion	28
2.2.1	Allergische Rhinitis als Typ1- Reaktion	28
2.3	Pollen als Allergenträger	32
2.3.1	Proinflammatorische Substanzen aus Pollen	35
2.4	Wirkungsweise von Antihistaminika	38
2.4.1	Klassische Wirkungsweise der Histamin 1- Rezeptorblocker	38
2.4.2	Antiallergische Zusatzwirkungen moderner Antihistaminika	41
<b>3</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>44</b>

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>45</b>
4.1	Material	45
4.1.1	Probanden	45
4.1.2	Pollen	46
4.1.3	Antikörper	46
4.1.4	Geräte, Lösungen, Puffer	46
4.1.4.1	Chemikalien	46
4.1.4.2	Puffer	48
4.1.4.3	Verbrauchsmaterial	48
4.1.4.4	Geräte	48
4.2	Methoden	49
4.2.1	Herstellung von Extrakten aus Pollen	49
4.2.1.1	Herstellung von wässrigen Pollenextrakten	49
4.2.2	Herstellung von Lipidextrakten aus Pollen	50
4.2.2.1	Herstellung von Lipidextrakten mittels Hexan-Isopropanol-Extraktion in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. I. Feußner	50
4.2.2.2	Aufreinigung der Lipidextrakte mit Hilfe der RP-HPLC in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. I. Feußner	50
4.2.3	Isolation von neutrophilen Granulozyten (PMN)	52
4.2.3.1	Vorinkubation von Neutrophilen mit Desloratadin	54
4.2.3.2	Vorinkubation der Neutrophilen mit einem selektiven LTB <sub>4</sub> -Rezeptorantagonisten (LY293111)	55
4.2.4	Transwell-Migrationsassay	55
4.2.5	Prinzip der Durchflußzytometrie	57

4.2.5.1	Durchflußzytometrische Quantifizierung migrierter neutrophiler Granulozyten	60
4.2.5.2	Durchflußzytometrische Darstellung der Oberflächenexpression von CD11b	61
4.2.5.3	Durchflußzytometrische Messung des transienten Kalziumflusses	62
4.2.5.4	Durchflußzytometrische Untersuchung der Apoptose bzw. Nekrose	63
4.2.6	MPO-Radioimmunoassay	64
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>65</b>
5.1	Einfluß von Pollenextrakten auf Effektorfunktionen von Neutrophilen	65
5.1.1	Einfluß von Pollenextrakten auf die Chemotaxis von PMN	66
5.1.1.1	Chemotaktische Wirkung von wässrigen Extrakten verschiedener Pollenspezies	67
5.1.1.2	Chemotaxisvergleich von PMN von Atopikern und Nicht-Atopikern auf wässrige Pollenextrakte	68
5.1.1.3	Einfluß des selektiven LTB <sub>4</sub> -Rezeptorantagonisten LY293111 auf die chemotaktische Wirkung von wPE	69
5.1.1.4	Chemotaktische Wirkung von Lipidextrakten von Birken- und Gräserpollen auf PMN	71
5.1.2	Untersuchung der Kalziummobilisation in Neutrophilen durch wasserlösliche Pollenbestandteile	73
5.1.3	Konstitutive und induzierte CD11b-Expression	77
5.1.4	MPO-Freisetzung aus Neutrophilen	79

5.1.4.1	MPO-Freisetzung aus Neutrophilen nach Stimulation mit wässrigen Extrakten verschiedener Pollenarten	79
5.1.4.2	MPO-Freisetzung aus Neutrophilen nach Stimulation mit Lipidextrakten von Birken- und Lieschgraspollen	80
5.2	Wirkung von Desloratadin auf Effektorfunktionen von Neutrophilen	82
5.2.1	Hemmung der Chemotaxis und Chemokinese	82
5.2.2	Einfluß von Desloratadin auf die Expression von CD11b	83
5.2.3	Hemmung der Degranulation von Neutrophilen durch Desloratadin	85
5.2.4	Toxizitätstests mittels Annexin V-/ Propidiumjodidfärbungen	86
6	Diskussion	88
6.1	Wirkung von Polleninhaltsstoffen auf neutrophile Granulozyten	88
6.2	Bewertung der Relevanz der Ergebnisse für die allergische Reaktion	94
6.3	Antiinflammatorische Potenz von Desloratadin	97
7	Zusammenfassung	102
8	Literaturverzeichnis	104
9	Danksagung	141
10	Lebenslauf	142

## Verzeichnis der Abkürzungen

APZ	Antigen präsentierende Zelle
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
BLT1	hochaffiner LTB <sub>4</sub> -Rezeptor
BLT2	niedrigaffiner LTB <sub>4</sub> -Rezeptor
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CI	Confidence Interval
ECP	Eosinophilic Cationic Protein
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
fMLP	N-Formyl-Methionin-Leucyl-Phenylalanin
g	Gravitation
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating-Factor
h	Stunde
H <sub>1</sub> -Rezeptor	Histamin-Rezeptor 1
H <sub>2</sub> -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-4	Interleukin-4
IL-8	Interleukin-8
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
kDa	Kilo Dalton

LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
M	mol/Liter
MAK	monoklonaler Antikörper
MPO	Myeloperoxidase
MTP	Mikrotiterplatte
min	Minute
PAF	Platelet-Activating Factor
PALM	Pollen-assoziierte Lipidmediatoren
PBS	Phosphate buffered solution
PE	Phycocerythrin
Per CP	Peridin Chlorophyll
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>4</sub>
PJ	Propidiumjodid
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
wPE	wässrige Pollenextrakte

# 1 Einleitung

## 1.1 Allergie: Geschichtliches, Definitionen, Epidemiologie

Bei Allergien handelt es sich nicht um ein Problem der Moderne. Das Auftreten allergischer bzw. atopischer Erkrankungen kann bis in das Altertum zurückverfolgt werden, da bereits bedeutende Persönlichkeiten jenes Zeitalters darunter zu leiden hatten [Ring J. 1985], [Simons E, ed.1994]. Der Begriff Allergie wurde 1906 von dem Wiener Pädiater Clemens von Pirquet eingeführt, um zwischen nutzbringender und schädlicher Immunität zu unterscheiden. Er definierte Allergie als spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus nach Allergenkontakt [Pirquet, C.v. 1906].

Der oftmals synonym gebrauchte Begriff „Atopie“, wurde 1923 von Coca und Cooke eingeführt, wodurch die häufig zusammen auftretenden Erkrankungen Asthma bronchiale, Rhinitis allergica (Heuschnupfen) und atopische Dermatitis erstmals als zusammenhängender Formenkreis definiert wurden. Bereits damals erkannte man die vererbte Prädisposition als charakteristisches Merkmal der Atopie [Coca, A.F. und Cooke, R.A. 1923].

Ein weiterer Meilenstein in der Systematik allergischer Erkrankungen war die Einteilung der allergischen Reaktionen in vier Typen (I bis IV) durch Coombs und Gell im Jahre 1963 [Coombs, R.R.A., Gell, P.G.H.1963]. Nach Ring wird Allergie heute als „spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“ [Ring, J. 1995] verstanden.

Bei der Typ I-Reaktion handelt es sich um eine Immunglobulin E-vermittelte Soforttypreaktion, die mit Krankheitsbildern wie allergischer Rhinitis, allergischem 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,

die Serumkrankheit, die allergische (Immunkomplex-) Vaskulitis und die exogen allergische Alveolitis zu nennen. Klassisches Beispiel einer Typ IV-Allergie ist die Kontaktdermatitis. Später wurden noch die granulomatöse Reaktion wie z. B. bei Injektionsgranulomen auftretend als Typ V-Allergie [Ring, J. 1995] und die "stimulierende" Überempfindlichkeit als Typ VI-Reaktion, wie bei der Autoimmunthyreoiditis, der Myasthenia gravis und der Insulin-Resistenz [Roitt, I. 1997], eingeführt. Allergische Erkrankungen gehören mittlerweile zu den großen Gesundheitsproblemen unserer Gesellschaft, da sie zum einen die Lebensqualität von Betroffenen beeinträchtigen und zum anderen durch den Verlust an Produktivität, aufgrund von krankheitsbedingten Fehltagen aber auch nicht zuletzt wegen steigender Kosten im Gesundheitswesen ein größer werdendes volkswirtschaftliches Problem darstellen [Malone, D.C. et al. 1997].

So liegt heute gemäß dem „European Allergy White Paper“ [Aas, K. et al. 1997: *European Allergy White Paper*] die Prävalenz der saisonalen allergischen Rhinitis in Europa bei etwa 15%, die Häufigkeit des allergischen Asthmas schwanken zwischen 2,5 und 10% und solche für die Prävalenz der atopischen Dermatitis zwischen 9 und 24%.

Eine Reihe von Arbeiten bestätigen einen stetigen Anstieg der Häufigkeit v.a. in den vergangenen zwei Dekaden, wobei dieser Trend in besonderem Maße für die westlichen, industrialisierten Ländern zu gelten scheint [*The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. 1998*]. Die wahrscheinlich multifaktoriellen Ursachen für dieses Phänomen sind letztlich bislang nicht geklärt. Allerdings werden zahlreiche Einflußgrößen, wie die Veränderung des Lebensstils und gesellschaftliche Veränderungen als möglicherweise krankheitsbegünstigende Faktoren diskutiert [Riedler, J. 2000], [Braun-Fahrländer, C. 1999], [Le Souef, P. 2000]. Zu diesen Faktoren werden u.a. Familiengröße, Stillzeit, Ernährung [Kuehr, J. et al. 1992], Bauweise [Custovic, A. et al. 1994], [Wickmann, M. et al. 1994] und Nikotinexposition [Kulig, M. et al. 1999] gerechnet. Vor dem Hintergrund vergleichsweise niedrigerer Prävalenzraten in Ländern mit schlechteren hygienischen Bedingungen werden auch die hohen Hygienestandards der westlichen Industriegesellschaften für die Zunahme der Atopie-Prävalenz verantwortlich gemacht, aufgrund derer sich v.a. das kindliche

Immunsystem weniger mit pathogenen Keimen, bakteriellen Endotoxinen und Parasiten auseinandersetzen muß. Von Anhängern dieser sog. „Hygiene“-Hypothese wird ein solches Training des Immunsystems als protektiver Faktor gegen die Atopie-Entwicklung angesehen [Larrick, J.W. et al. 1983], [Gassner-Bachmann, M. und Wüthrich, B. 2000].

In diesem Zusammenhang ist auch besonders die Hypothese zu erwähnen, daß veränderte Umwelteinflüsse für die Zunahme der allergischen Erkrankungen ursächlich sein könnten. Dieser Ansatz hatte sich aus den Ergebnissen verschiedener epidemiologischer Studien ergeben, wobei v.a. die Zunahme der straßenverkehrsbedingten Luftschadstoffe mit dem vermehrten Auftreten von Atopikern in Verbindung gebracht wurde [Ring, J. et al. 1999], [Behrendt, H. et al. 1995], [Diaz-Sanchez, D. et al. 1997], [Krämer, U. et al. 2000].

Mit dem bisherigen Verständnis der Pathomechanismen allergischer Erkrankungen kann das Phänomen der stetig steigenden Prävalenz nicht erklärt werden. Die bisherige Lehrmeinung geht davon aus, daß Allergene über die Aktivierung von Allergen-spezifischen T- und B-Zellen die allergische Reaktion initiieren und alle weiteren inflammatorischen Prozesse von intrinsisch aktivierten Substanzen unterhalten werden. Einflüsse des innaten Immunsystems auf die allergische Reaktion sind bislang wenig untersucht worden. Auch Allergen-unabhängige Wechselwirkungen von Allergenträgern, wie Pollenkörnern mit Immunzellen sind bislang meist unberücksichtigt geblieben. Insbesondere mit Hinblick auf den Befund unserer Arbeitsgruppe, daß Pollenkörner, neben dem Allergen, Eikosanoid-ähnliche Stoffe freisetzen können, entstand die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, in deren Rahmen untersucht werden soll, welchen Einfluß diese nicht-allergenen Polleninhaltsstoffe auf neutrophile Granulozyten ausüben können.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Physiologie von neutrophilen Granulozyten

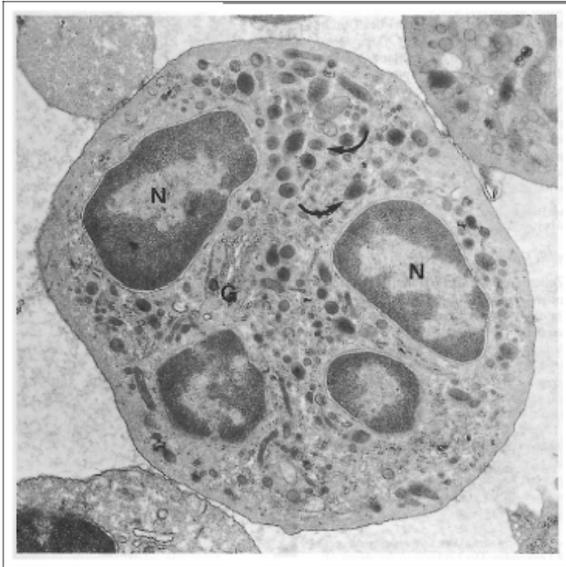


Abbildung 2.1-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines PMN. N = Zellkern, G = Golgi-Apparat. Die Pfeile weisen auf spezifische neutrophile Granula. Vergr. 15 000-fach, (Abbildung aus Schiebler, T.H., Peiper, U. und Schneider, F.: Blut. In: Histologie, 275-278. Springer Verlag, 1986)

Granulozyten, die wegen ihres polymorphen Zellkerns auch polymorphonukleäre Leukozyten (PMN) genannt werden, sind mit 40–65% die häufigsten weißen Blutkörperchen im menschlichen Körper. Sie sind durch einen segmentierten Kern und intrazelluläre Granula gekennzeichnet [Malech, H. L., Gallin, J. I. 1987]. Aufgrund des Färbeverhaltens ihrer Granula, lassen sie sich weiter unterteilen in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, wobei die Neutrophilen mit etwa 60% die größte Fraktion darstellen. Nach Entwicklung und Reifung aus Vorläuferzellen der myeloischen Reihe im Knochenmark unter Einwirkung von IL-3 und GM-CSF (*Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor*) [Bainton, D.F. et al. 1971], zirkulieren normalerweise etwa  $3\text{-}5 \times 10^6$  Neutrophile / ml mit einer durchschnittlichen Halbwertszeit von etwa 6-7 Stunden

im peripheren Blut. Im Falle einer Aktivierung durch Entzündungsmediatoren, kann ihre Lebenszeit durch Hemmung der Apoptose allerdings deutlich verlängert werden und es kommt über Stimulation des Knochemarks zu einer vermehrten Produktion von PMN [Cox, G. et al. 1992]. Dadurch ist im Bedarfsfall eine rasche Vermehrung bis zum Zehnfachen der normalen Zellkonzentration möglich. Nach ihrem Einsatz werden sie durch das retikuloendotheliale System vor allem in der Leber und der Milz abgebaut [Kanzow, G. 1994]. Sie haben einen Durchmesser von 10-15 µm und sind durch ihre Fähigkeit zur gerichteten Wanderung (Chemotaxis) [Boyden, S. 1962], [Niggli, V. 2003] und ihrer hohen Zahl im Blut schnell am Ort der Infektion und stellen gleichsam die Zellen der ersten Verteidigungslinie dar. So ist es ihre vordringliche Aufgabe, den Körper vor Besiedlung und Ausbreitung von Pilzen und Bakterien zu schützen. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind sie ohne vorherigen Antigenkontakt in der Lage, Fremdorganismen durch gerichtete Zellwanderung aufzuspüren und mittels Phagozytose und der Sekretion von Enzymen und Sauerstoffradikalen zu eliminieren [Baggiolini, M. 1991].

### **2.1.1 Die Rolle der PMN in Entzündungsreaktionen**

Die im Blut zirkulierenden PMN befinden sich im inaktiven Zustand. Tritt ein Erreger in das Gewebe ein, wird er von ortsständigen Gewebsmakrophagen und Langerhans-Zellen als fremd erkannt. Daraufhin sezernieren diese Zytokine, z.B. Interleukin-1 (IL-1), Chemoattraktanzien, wie Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) oder Chemokine, wie Interleukin 8 (IL-8), die durch interstitielle Diffusion unter Ausbildung eines Konzentrationsgradienten den Infektionsherd markieren und es den Neutrophilen ermöglichen, gezielt in entzündete Areale einzuwandern [Bokoch, G. M. 1995].

Das Übertreten der PMN aus der Blutbahn in diese Areale erfolgt nach einem für alle Leukozyten gültigen Prinzip, der sog. Adhäsionskaskade. Dabei kommt es in einem ersten Schritt zur Rekrutierung und Margination von PMN, d.h.

zirkulierende Zellen werden wandständig. Als Nächstes kommt es zu einer Aktivierung von Endothelzellen der Blutgefäße. Es resultiert eine Expression von P- (CD62P) und E-Selektin (CD62E) (Plättchen- und Endothelselektin), sowie von interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) [Menger, M. D und Vollmar, B. 1996] auf ihrer Oberfläche. Zugleich werden auf den PMN die Leukozyten-spezifischen L-Selektine ausgebildet. Besitzen nun das Endothel und der Leukozyt Selektine und deren Liganden, so führen deren Wechselwirkungen zu Bindungen, die nicht stabil genug sind, vollständigen Arrest auszulösen [Picker, L. J. et al. 1991]. Sie halten aber die Zelle in Kontakt mit der luminalen Oberfläche des Gefäßes und reduzieren die Geschwindigkeit von etwa 4 mm/s auf ca. 40 µm/s. Es resultiert das „Rollen“, ein physiologischer Vorgang, der allein noch keine leukozytäre Rekrutierung bedingt, da bei Fehlen weiterer Aktivierungsschritte sich die Zelle wieder löst und vom Blutstrom mitgerissen wird. Kommen die PMN in die nötige räumliche Nähe zu den sezernierten Chemokinen, so können diese über häufig G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren auf den PMN [Bokoch, G. M. 1995] eine Konformationsänderung der PMN mit verschiedenen physiologischen und morphologischen Veränderungen herbeiführen. Die G-Proteine wiederum fungieren als Verbindungsstück zwischen den Plasmamembranrezeptoren und den intrazellulären Enzymen wie Phospholipasen und Proteinkinasen. Eine Steigerung der Phospholipase C- (PLC-) Aktivität, wie sie etwa durch Bindung des Lipidmediators LTB<sub>4</sub> an seinen Rezeptor ausgelöst wird [Hauser, C.J. et al. 2000], führt über die Bildung des "Second messengers" IP<sub>3</sub> zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]; für ein paar Sekunden von ca. 100nM auf Werte im Mikromolarbereich [Clapham, D.E. et al. 2001]. Daneben kommt es zu einer vermehrten Steigerung der Phospholipase D-Aktivität [Condliffe, A.M. et al. 1998], einhergehend mit der Produktion von Superoxidanionen und der Freisetzung von Lipidmediatoren wie LTB<sub>4</sub> aus den PMN selbst. Desweiteren werden die Neutrophilen im Zuge dieses auch als „*Priming*“ bezeichneten Prozesses [Edwards, S.W. 1994] polarisiert, sie nehmen eine amöboide Form an und bilden Pseudopodien aus. Zugleich bewegen sich sekretorische Vesikel auf die Zellmembran zu und fusionieren mit ihr, wodurch es zur vermehrten Bereitstellung von Rezeptoren und anderen Proteinen auf der Zelloberfläche kommt. Dabei wird

auch das Integrin CD11b im hochaffinen Zustand auf der Zelle ausgebildet [Oxvig, C. et al.1999]. Die nun auftretende Wechselwirkung zwischen CD11/CD18 mit ICAM-1 des Endothels führt zum Stillstand und zum festen Arrest der PMN [Diamond, M. S. et al. 1990] und zur Transmigration der Zellen zwischen den Endothelzellen hindurch [Lawrence, M. B. und Springer, T. A. 1991]. Die PMN flachen sich ab und wandern mittels homophiler PECAM-1-Wechselwirkungen (Plättchen-Endothelzell-Adhäsions-molekül 1, CD31) zwischen Leukozyten und Endothelzellen zu den Kontaktstellen zweier Endothelzellen [Wakelin, M. W. et al. 1996]. Dort durchdringen die PMN die Endothelwand und migrieren in das darunter liegende Gewebe. Der Kontakt der benachbarten Endothelzellen wird durch die Familie der Cadherinproteine vermittelt, die einen reißverschlußartigen Gürtel bilden. Vermutlich löst die Leukozytenadhäsion in den Endothelzellen das Signal zu einer transienten Auflösung des Kontaktes zur Nachbarzelle aus. Die Granulozyten können nun die Endothelwand durchwandern. Sind die PMN in das Gewebe eingedrungen, so werden sie durch das Konzentrationsgefälle an sezernierten Chemokinen und Zytokinen chemotaktisch zum Infektionsherd geleitet [Syndermann, R. und Goetzl, E.J. 1981]. In Abb. 2.1.1 ist der Ablauf der Adhäsionskaskade schematisch dargestellt.

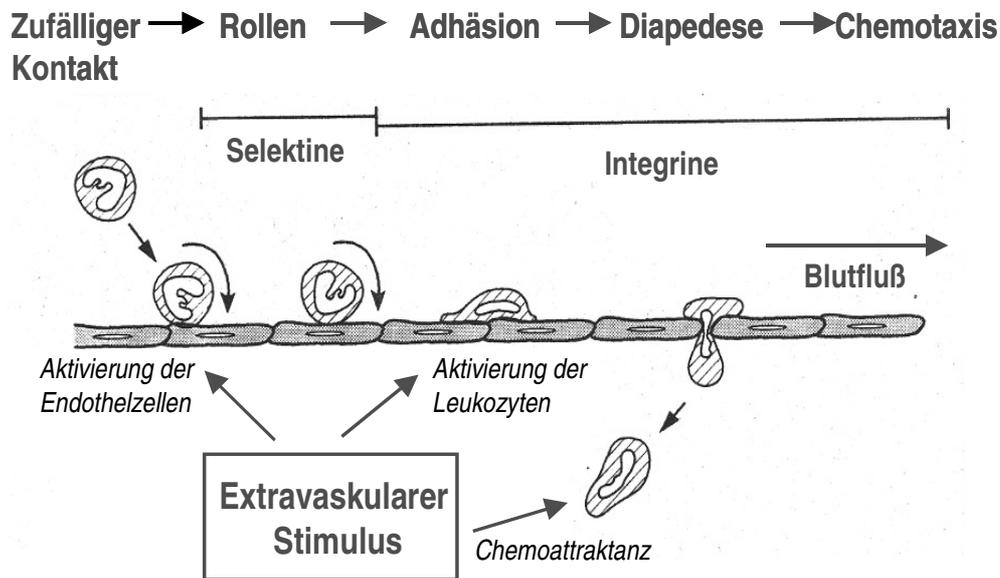


Abb.2.1.1: Die Adhäsionskaskade [aus L. A. Lasky: "Selectins: Interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation". *Science* 258 ( 1992) 964-969]

Am Entzündungsherd angekommen, phagozytieren sie Erreger und verstärken die Entzündungsreaktion durch Freisetzung eigener Chemokine. Als Voraussetzung für die Phagozytose ist es jedoch nötig, daß die PMN die pathogenen Organismen als fremd erkennen, was mit Hilfe der sog. Opsonine (z.B. Antikörper, Komplementfaktoren, Akut- Phase Proteine oder Fibronectin) gelingt. Die Opsonine sitzen an der Membranhülle. Die PMN besitzen Rezeptoren für Teile dieser Proteine und können die pathogenen Organismen so an sich binden. Nun kann das Fremdmaterial durch Adsorption und Ingestion in ein Phagosom eingeschlossen und mit Hilfe von zytotoxischen Substanzen eliminiert werden.

Zur Eliminierung des Fremdmaterials stehen den neutrophilen Granulozyten verschiedenartige Mechanismen zur Verfügung. So ist es ihnen möglich, vermittelt durch spezifische intrazelluläre Botenstoffe, ihren oxidativen Stoffwechsel explosionsartig zu steigern, was auch als „*Respiratory Burst*“ bezeichnet wird. Hierbei wird durch eine in der Plasmamembran enthaltene NADPH-Oxidase, die die  $O_2$  -Produktion katalysiert eine Reihe von Sauerstoffmetaboliten mit breiten

antimikrobiellen Eigenschaften [Bellavita, P. 1988]. Die Oxidase besteht aus drei Komponenten, die in der Plasmamembran, im Zytoplasma und auf Membranen einiger Granula lokalisiert sind. Während der Phagozytose werden diese Komponenten zu einem Aktiv–Enzym–Komplex in der Zellmembran vereinigt. Dieser Komplex bildet reaktive Oxidanzien, die zur Abtötung des pathogenen Organismus führen.

Die zytoplasmatischen Granula bilden die zweite Säule der Abwehr. Sie enthalten eine Reihe von zytotoxischen Proteinen wie z.B. Proteasen, hydrolysierende Enzyme und Peroxidasen, die nach abgelaufenem "Respiratory Burst" die pathogenen Keime meist vollständig abbauen können [Weissmann, G. und Korachak, H.M. 1980].

### **2.1.2 Granula und Rezeptoren der PMN**

PMN besitzen vier verschiedene Arten von Granula, nämlich primäre oder azurophile Granula, sekundäre Granula, Gelatinasegranula, sowie sekretorische Vesikel, die Enzyme, Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und Proteine mit antimikrobieller Aktivität beinhalten [Borregard, N. und Cowland, J.B. 1997]. Zytokine können die Expression von Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen mittels Degranulation induzieren und so phänotypische und funktionelle Merkmale der Zellen verändern. *In vitro* und *in vivo* läßt sich nach Stimulation mit Zytokinen oder Chemokinen eine feste Reihenfolge der Verschmelzung der verschiedenen Granula mit der Zellmembran beobachten [Sengelov, H. et al.1995]. Zuerst degranulieren die sekretorischen Vesikel, als nächstes die Gelatinasegranula, gefolgt von den sekundären und primären Granula.

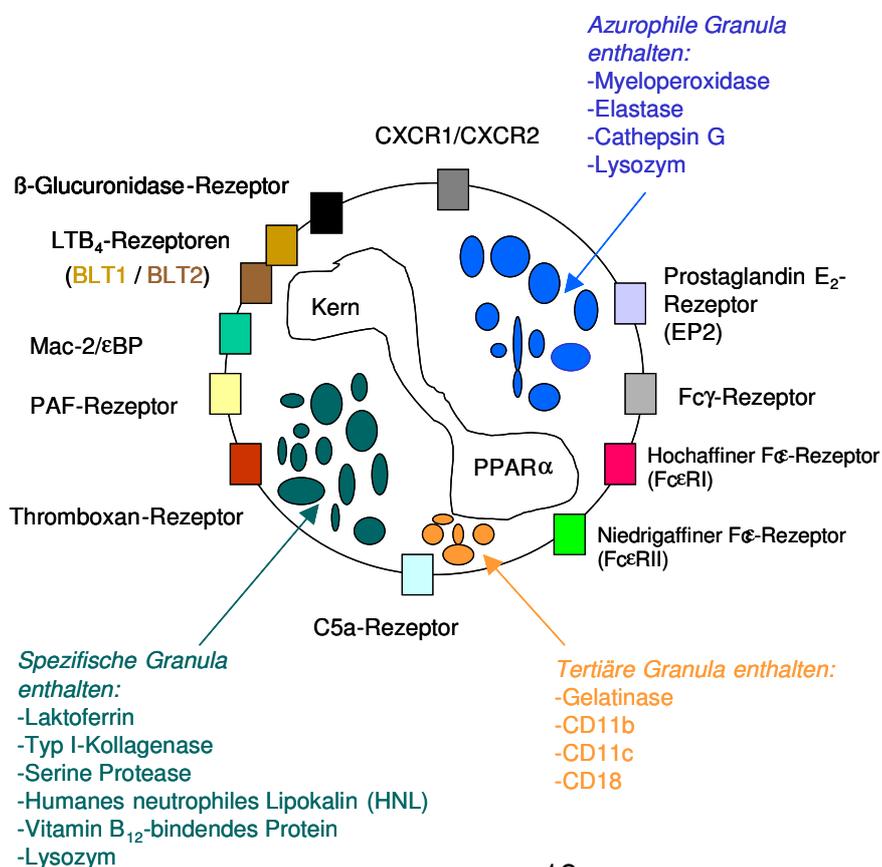
Die primären, azurophilen Granula beinhalten neben dem die Perchloratproduktion katalysierenden Enzym Myeloperoxidase (MPO) vor allem Säurehydrolasen, Elastase, Cathepsin G und Lysozym saure Phosphatase, kationische Proteine und Defensine, die als cysteinreiche Proteine ein breites Abwehrspektrum gegen Bakterien, Pilze und einige Viren aufweisen.

In den spezifischen, sekundären Granula sind u. a. das bakterizide eisenbindende Protein Laktoferrin, Kollagenasen, alkalische Phosphatasen und Aminopeptidasen sowie spezifische Bestandteile wie Laktoferrin, Vitamin-B<sub>12</sub>-Bindungsproteine, Serin-Proteasen sowie Humanes Neutrophiles Lipokalin (HNL) und Membrananteile der NADPH-Oxidase, die in der Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite eine wichtige Rolle spielt, sowie der Rezeptor für das Zytokin Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) lokalisiert.

In den Gelatinasegranula sind neben der Metalloprotease Gelatinase, dem Rezeptor für das N-formylierte Peptid fMLP aus gramnegativen Bakterien auch die Adhäsionsmoleküle CD11b und CD18 zu finden.

Die sekretorischen Vesikeln enthalten u.a. CD11b und CD18, CD 87, CD 16/Fc $\gamma$ RIII, CD14, CD13, CD10, CD45 alkalische Phosphatase und den fMLP-Rezeptor.

Einen Überblick über Granula und Rezeptoren gibt auch Abb.2.1.2-1:



### 2.1.3 Aktivatoren neutrophiler Granulozyten

Die meisten Aktivatoren der PMN wirken über die Bindung an Rezeptoren der Plasmamembran. Ihre derzeit bekannten physiologischen Hauptaktivatoren werden nachfolgend näher beschrieben:

#### Zytokine:

Die wichtigsten Zytokine, die in Entzündungsreaktionen entstehen und PMN beeinflussen können, sind Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , Interleukin-1 und Interferon  $\gamma$ .

#### *Tumor-Nekrose-Faktor:*

Green et al. entdeckten 1976 eine Substanz, die zur Nekrose von Tumorzellen führte, weshalb sie diese als Tumor-Nekrose-Faktor (TNF $\alpha$ ) bezeichneten [Green, S. et al. 1976]. TNF $\alpha$  ist ein 45 kDa großes inflammatorisches Cytokin, das von Makrophagen und Monozyten während der akuten Entzündungsphase produziert wird [Idriss, H.T., Naismith und J.H. 2000]. Es führt bei PMN zur Expression von L-Selektin und CD18 und inhibiert deren Chemotaxis. Auf Endothelzellen führt es zur Induktion von P-Selektin, ICAM-1 und IL-8 [Bachert, C. et al. 1995].

#### *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 [Tiku, K. et al. 1986]. Die biologischen Effekte umfassen, neben immungenen Wirkungen wie Fieber und Schmerzregulation [Dinarello, C. A. 2000], die Rekrutierung von PMN aus dem Knochenmark [Reale, M. et al. 1996], die Stimulation der Synthese und Freisetzung von Akut-Phase-Proteinen und die T- und B- Zell-Stimulation. Ebenso wie TNF führt IL-1 zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und auf PMN [Bachert, C. et al. 1995] und verstärkt zudem die Bildung von freien Radikalen und die fördert die Degranulation, wodurch eine Erhöhung der

Zytotoxizität der Zellen erreicht wird.

#### *γ-Interferon:*

Das intrazellär vorhandene *γ-Interferon* (IFN $\gamma$ ) besitzt ein Molekulargewicht von 25 bzw. 20 kDa und das extrazelluläre IFN $\gamma$  hat eine Größe von 50 bzw. 25 kDa. IFN $\gamma$  wird aus T-Lymphozyten freigesetzt und verdankt seinen Namen der Fähigkeit, in die Replikation von Viren einzugreifen (*interfere*). In neutrophilen Granulozyten führt  $\gamma$ -Interferon zur Expression von Fc $\gamma$ RI (hochaffiner Rezeptor für IgG) [Cohen, D.M. 1997], steigert die Produktion von Sauerstoffradikalen und führt zur selektiven Stimulation der Proteinbiosynthese [Scapini, P. 2000]. Daneben besitzen PMN auch Rezeptoren für verschiedene Chemoattraktanzien, die wie Leukotrien B<sub>4</sub>, Plättchen-aktivierender Faktor oder Komplementfaktor C5a in einer Vielzahl von Zelltypen, wie Endothel-, Epithel- und Parenchymzellen, Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten aber auch in PMN selbst, gebildet werden. Daneben ist zu den typischen Chemoattraktanzien für PMN auch das bakterielle Peptid N-Formyl-Methionin-Leucyl-Phenylalanin zu zählen.

#### *Leukotrien B<sub>4</sub>*

In Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit ist das zu den Eikosanoiden zählende Leukotrien B<sub>4</sub> von besonderem Interesse. Mit dem Begriff Eikosanoide sind die Metabolite der mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>-Fettsäuren gemeint, wobei die wichtigsten Gruppen dieser auch als Lipidmediatoren bezeichneten Substanzen die oxygenierten Derivate der Arachidonsäure (AA) und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) sind. Die Bildung dieser Lipidmediatoren erfolgt im menschlichen Organismus in fast allen Zellen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Nachgewiesen ist sie für neutrophile [Borgeat, P. und Samuelsson, B. 1979], [Samuelsson, B. et al. 1979], eosinophile [Goetzi, E.J. und Pickett, W.C. 1980] und basophile Granulozyten [Ford-Hutchinson, A.W. et al. 1982], Monozyten [Bray, M.A. et al. 1981], Makrophagen [Doig, M.V. und Ford-Hutchinson, A.W. 1980],

Mastzellen [Freeland, H.S. et al. 1988] und dendritische Zellen [Ruzicka, T. und Abock, J. 1987] aber auch in anderen Zelltypen, wie z.B. Keratinozyten [Grabbe, J. et al. 1985].

Die Synthese der Lipidmediatoren erfolgt dabei über die Metabolisierung der AA, die im Wesentlichen auf zwei Wegen ablaufen kann. Zum einen durch die Cyclooxygenasen, deren Produkte die verschiedenen Prostaglandine und Thromboxane sind. Zum anderen über Lipoxygenasen, deren Hauptprodukte die Leukotriene sind. Im folgenden soll v.a. auf den Lipoxygenaseweg eingegangen werden (vgl. Abb.2.3.2-1). Bekannt sind mehrere Lipoxygenasen, die jeweils in verschiedenen Zelltypen bevorzugt vorhanden sind. Sie unterscheiden sich durch die Oxygenierung unterschiedlicher C-Atome der AA. In PMN liegt die 5-Lipoxygenase (5-LOX) vor. Das erste Produkt der 5-LOX ist das kurzlebige 5-HPETE, das in das instabile LTA<sub>4</sub> übergeht. In PMN, Monozyten und Makrophagen der Lunge wird LTA<sub>4</sub> zu LTB<sub>4</sub> reduziert [Borgeat, P. 1990].

Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) besitzt ein Molekulargewicht von 336,5 kDa und ist einer der stärksten bekannten chemotaktischen Faktoren für neutrophile Granulozyten [Ford-Hutchinson, A.W., 1980]. Es wirkt auf PMN über spezifische G-Proteingekoppelte LTB<sub>4</sub>-Rezeptoren, durch die Chemotaxis, Zellaggregation und Adhärenz [Palmlad, J. et al. 1981], Degranulation und Sauerstoffproduktion [Palmlad, J. et al. 1984] von Neutrophilen ausgelöst werden. Die G-Proteine sind mit der Phospholipase C-Aktivität gekoppelt, so daß eine Zugabe von LTB<sub>4</sub> eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> verursacht [Hauser, C.J. et al. 2000]. Neben seiner starken chemokinetischen und chemotaktischen Wirkung auf neutrophile Granulozyten [Ford-Hutchinson, A.W. et al. 1980], hat LTB<sub>4</sub> ebenfalls eine, wenn auch schwächere, chemotaktische Wirkung auf eosinophile Granulozyten [Nagy, L. et al. 1982], Monozyten [Czarnetzki, B.M. 1983] und Fibroblasten [Mensing, H. und Czarnetzki, B.M. 1984]. LTB<sub>4</sub> führt außerdem zur Aggregation [Ford-Hutchinson, A.W. et al. 1980], Degranulation [Goetzl, E.J. und Pickett, W.C., 1980]. Desweiteren wird durch LTB<sub>4</sub> eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Ödembildung der Haut [Björk, J. et al. 1983] und die Produktion eines viskösen Schleims in der Lunge induziert [Marom, Z. et al. 1982]. In jüngerer Vergangenheit wurde der LTB<sub>4</sub>-Rezeptor näher untersucht, wobei zwei unterschiedliche Typen von

G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für  $\text{LTB}_4$  identifiziert und charakterisiert wurden. Danach unterscheidet man den spezifischeren hochaffinen BLT1-Rezeptor, der fast ausschließlich auf Leukozyten exprimiert wird [Yokomizo, T. et al. 1997] vom niedrigaffinen BLT2-Rezeptor, der auf Leukozyten, aber auch anderen Zelltypen vorkommt und auch mit anderen Eikosanoiden als  $\text{LTB}_4$  Bindungen eingeht [Yokomizo, T. et al. 2000]. Auf humanen PMN werden beide Subtypen ausgebildet [Kamohara, M. et al. 2000], wobei von Yokomizo erhobene Befunde dafür sprechen, daß bekannte Eikosanoidwirkungen auf Neutrophile, wie Chemotaxis und Kalziummobilisierung über BLT2 vermittelt werden [Yokomizo, T. et al. 2000].

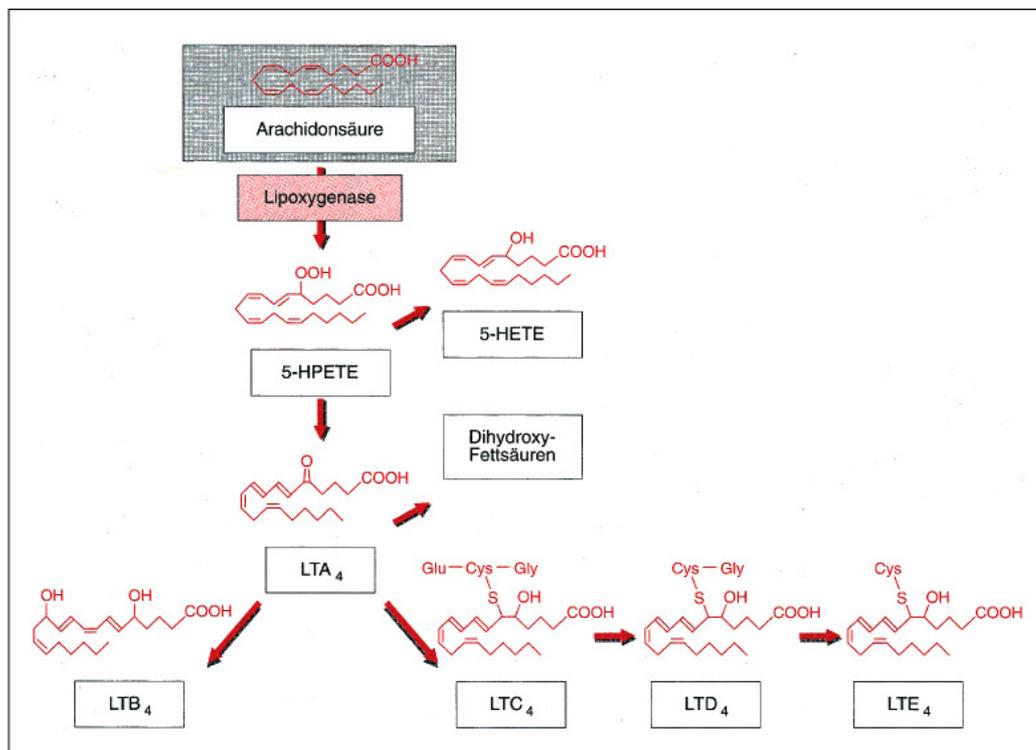


Abbildung 2.1.3: Der Lipoxigenaseweg.

Aus: Düsing, R.: Innere Sekretion – Gewebshormone – Eikosanoide.

In: Krück, F. (Hrsg): Pathophysiologie Pathobiochemie, 423–429. U & S 1994]

### *Platelet-Activating Factor*

Der Platelet-Activating Factor (PAF) ist ein 43 kDa großes Phospholipid mit starken biologischen Mediatoreigenschaften [Lynch, J.M. et al. 1984]. Es wird bei Bedarf von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und Gefäßendothelzellen gebildet und freigesetzt.

Die Wirkungen von PAF in PMN bestehen u.a. in der Stimulation der AA-Freisetzung und deren Metabolisierung zu 5-, 11- und 15-HETE und LTB<sub>4</sub>, wodurch verschiedene Zellfunktionen ausgelöst werden (s.o.). PAF bewirkt in PMN aber auch selbst Chemotaxis, Zellaggregation und Adhärenz, Induktion des *Respiratory Burst* und die Produktion reaktiver Oxidanzien sowie Degranulation [Snyder, F. 1990]. Allgemeine PAF-Wirkungen sind darüber hinaus Bronchokonstriktion [Vargaftig, B.B. et al. 1980], Steigerung der Gefäßpermeabilität und Senkung des Blutdrucks [Caillard, C.G. et al. 1982].

### *Komplementfaktor 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 [Boyden, S. 1962]. C5a besitzt ein Molekulargewicht von 15 kDa. Auf neutrophilen Granulozyten sind ungefähr  $1-3 \times 10^5$  Rezeptoren für C5a vorhanden, die an G-Proteine gekoppelt sind. C5a besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten wie auch auf Monozyten [Harvath, L. 1991] und induziert außerdem die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an humanen Gefäßendothelzellen [Jagels, M. A. et al. 2000].

### *N-Formyl-L-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin:*

PMN besitzen spezifische Rezeptoren für das bakterielle Peptid N-Formyl-L-Methionin-L-Leucin-L-Phenylalanin (fMLP), über die seine zahlreichen Wirkungen konzentrationsabhängig vermittelt werden [Borregaard, N. und Cowland, J.B. 1997]. Zu diesen zählen u.a. Chemotaxis und die Produktion reaktiver Oxidanzien [Dahlgren, C. und Follin, P. 1990]. Zudem führt es zu Veränderungen im Zytoskelett und zur Degranulation [Panaro, M.A. und Mitolo, V. 1999].

### Chemokine:

Chemokine sind eine Gruppe 8-14 kDa großer Proteine, bei denen anhand der N-terminalen Lage zweier benachbarter Cysteinreste [Kelner, G.S., et al. 1994] zwei große Familien unterschieden werden. So sind die  $\alpha$ -Chemokine dadurch gekennzeichnet, daß ein beliebiger Aminosäurerest die beiden Cysteine von einander trennt und werden somit auch als CXC-Chemokine bezeichnet, während die  $\beta$ -Chemokine keine Trennung zwischen den Cysteinresten aufweisen und CC-Chemokine heißen. Auf neutrophile Granulozyten wirken allerdings nur die  $\alpha$ -Chemokine, wobei Interleukin-8, das entweder über CXCR1 und CXCR2 agiert, das wichtigste Chemokin für Neutrophile darstellt.

### *Interleukin-8:*

Interleukin-8 (IL-8) gehört zu den stärksten proinflammatorischen Chemokinen. Es handelt sich um ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 8 kDa, das bei neutrophilen Granulozyten G-Protein-vermittelt die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1), Chemotaxis, wie auch die Freisetzung von Enzymen und Produktion von Sauerstoffradikalen bewirkt, wie von BAGGIOLINI ausführlich untersucht [Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L. 1989], [Baggiolini, M.

1992]. Die PMN selbst können aber auch IL-8 freisetzen. U.a. fördern LPS [Sveen, K. und Hofstad, T. 1976], IL-1 und TNF $\alpha$  eine Freisetzung von IL-8 aus Neutrophilen. Die Freisetzung von Interleukin-8 korreliert mit der Anzahl von Granulozyten auf der Nasenschleimhaut [Bachert, C. und Ganzer, U. 1993]. Nach nasaler Allergenstimulation kommt es zur Freisetzung von IL-8 durch Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [Jacobi, H.H. et al. 1988]. Bei Untersuchungen des Nasensekretes von Patienten mit allergischer Rhinitis fand man signifikant erhöhte Werte von IL-8 (Pollinotiker  $465 \pm 38$  pg/ml, Kontrollpersonen  $85 \pm 16$  pg/ml) [Bachert, C. et al. 1995]. Poulsen et al. [Poulsen, L. et al. 1994] wiesen nach Allergenexposition erhöhte Interleukin-8 und MPO-Konzentrationen in der nasalen Lavage bei Patienten mit allergischer Rhinitis nach.

#### **2.1.4 Rolle der Neutrophilen bei der IgE-vermittelten allergischen Reaktion**

Von den Zellen des innaten Immunsystems ist die Bedeutung der eosinophilen Granulozyten als Effektorzellen der allergischen Reaktion heute unumstritten [Macfarlane, A.J. et al. 2000], wohingegen die Rolle neutrophiler Granulozyten in der Typ 1 Reaktion noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion ist. Eine Reihe von Hinweisen sprechen jedoch für eine aktive Beteiligung in der Initiierungsphase der allergischen Reaktion.

So wurde bereits zu Anfang der achtziger Jahre von Henson und Betz die Rolle von neutrophilen Granulozyten in der allergischen Reaktion sowie der Einfluß von PAF auf diese Reaktion diskutiert [Henson, P. M. und Betz, S. J. 1981]. Da die neutrophilen Granulozyten aufgrund ihrer Vielzahl und ihrer chemotaktischen Potenz als Zellen der „ersten Verteidigungslinie“ gelten, weswegen sie möglicherweise als erste Immunzellen mit dem Allergenträger in Kontakt treten, beschäftigten sich einige weitere Arbeitsgruppen mit dieser Hypothese und fanden erhöhte Konzentrationen von Neutrophilen bzw. deren Mediatoren im Nasenabstrich von atopischen Probanden [Henson, P.M. und Borish, L.C. 1995],

[Lim, M.C. et al. 1995]. So konnte gezeigt werden, daß der Entzündungsmediator NCA (*Neutrophil Chemotactic Activity*) nach Allergenprovokation bei Asthmatikern erhöht ist [Atkins, P.C. et al. 1979], [Kowalksi, M.L. et al. 1993]. NCA führt zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten [Nagy, L. et al. 1982].

In den neunziger Jahren wurden neue Arbeiten vorgelegt, die den Zusammenhang zwischen PMN und Soforttyp-Allergie zum Inhalt hatten. Miadonna et al. konnten ebenfalls eine erhöhte nasale Neutrophilenzahl durch einmalige Allergenprovokation atopischer Probanden provozieren [Miadonna, A. et al. 1999]. Bei Asthmatikern ist eine gesteigerte Sauerstoffradikalbildung durch neutrophile Granulozyten beschrieben worden [Teramoto, S. et al. 1996].

Collison et al. konnten in ihren Versuchen mit monomerem IgE beispielsweise einen Anstieg des Kalziumeinstroms bei neutrophilen Granulozyten hervorrufen [Collison, K.S. et al. 1995]. In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, daß neutrophile Granulozyten über drei Rezeptoren Bindungen mit IgE eingehen können: Mac-2/εBP [Truong, M.J. et al. 1993], der niedrigaffine Rezeptor für IgE (FcεRII/CD23) [Yamaoka, K. A. et al. 1996]. Neueste Untersuchungen zeigen, daß die neutrophilen Granulozyten von Asthmatikern auch den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) exprimieren, dem ja eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der allergischen Sofortreaktion zukommt (siehe Abschnitt 2.2.1) [Gounni, A. S. et al. 2001].

Aufgrund dieses Befundes war von Monteseirin et al. untersucht worden, ob die *in vitro*-Provokation von Neutrophilen mit spezifischen Allergenen zu funktionellen Reaktionen führten. Dabei zeigte sich, daß die Provokation von PMN atopischer Spender mit Allergenen, die bei diesen Probanden klinische Symptome hervorriefen, eine Freisetzung des zytotoxischen Enzyms Myeloperoxidase (MPO) auslöste. Dagegen wiesen PMN von Nichtatopikern diesen Effekt nicht auf [Monteseirin, J. et al. 2001].

Interessanterweise sind auf neutrophilen Granulozyten auch Histaminrezeptoren vorhanden. Sowohl der Histamin-1 (H<sub>1</sub>)- wie auch der Histamin-2 (H<sub>2</sub>)-Rezeptor werden exprimiert, wobei die Bindung am H<sub>1</sub>-Rezeptor zur Steigerung der Chemokinese führt [Seifert, R. et al. 1992a] und die Bindung

am H<sub>2</sub>-Rezeptor bei neutrophilen Granulozyten ebenfalls zur verstärkten Chemokinese und zum Anstieg des intrazellulären Kalziums führt, jedoch Chemotaxis und Degranulation reduziert werden [Seifert R. et al. 1992b].

Zuletzt hatten Kinhult et al. eine Beteiligung von neutrophilen Granulozyten bzw. von Mediatoren aus Neutrophilen an der allergischen Reaktion diskutiert, nachdem sie im Nasensekret von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis während der Hauptflugzeit der Gräserpollen eine vermehrte Expression des für Neutrophile typischen  $\beta_2$ -Integrins gefunden hatten. Außerdem wies das Nasensekret der Probanden erhöhte Konzentrationen an MPO auf, einem gängigen Marker für die Anwesenheit von Neutrophilen [Kinhult, J. et al. 2003].

All diese Hinweise sprechen für eine Bedeutung der Neutrophilen in der frühen Effektorphase der allergischen Reaktion und geben Anlaß dazu, bisher unerforschte Funktionen dieser Zellen näher zu beleuchten.

## **2.2 Grundlagen der allergischen Reaktion**

### **2.2.1 Allergische Rhinitis als Typ1- Reaktion**

Die allergische Rhinokonjunktivitis stellt die häufigste klinische Manifestation der Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis (allergische Rhinitis, allergisches Asthma bronchiale sowie atopische Dermatitis) dar. Es handelt sich dabei um eine allergische Entzündung der Nasenschleimhaut mit oder ohne Beteiligung der Konjunktiven infolge Überempfindlichkeit gegen Aeroallergene. In Abhängigkeit von den auslösenden Allergenen als saisonale Rhinokonjunktivitis (Baum-, und Gräserpollen) nur zu den jeweiligen Pollenflugzeiten oder als perenniale Rhinokonjunktivitis ganzjährig nach Allergenkontakt (z.B. Hausstaubmilbenkot, Tierepithelien, Schimmelpilze). Zu den Kardinalsymptomen zählen Juck- und Niesreiz, Rhinorrhoe und nasale Obstruktion [White, M.V. und Kaliner, M.A. 1992]. In bis zu 40 % der Fälle kommt es zu einem „Etagenwechsel“ mit der Folge eines Asthma bronchiale [Howarth, P.H. et al. 1991].

Nach der modifizierten Einteilung der Pathomechanismen von Allergien nach Coombs und Gell aus dem Jahre 1963 [Coombs, R.R.A. und Gell, P.G.H. 1963], handelt es sich bei der allergischen Rhinitis um die IgE vermittelte Soforttypreaktion (Typ I).

Pathogenese der IgE-vermittelten Reaktion:

Bevor es zur klinischen Manifestation einer Typ I Allergie kommt, erfolgt eine Sensibilisierung des Immunsystems gegen das betreffende Allergen, wobei diese Phase ohne klinische Symptome verläuft. Zur Sensibilisierung kann bereits der einmalige Kontakt mit einem Allergen ausreichen. Abb. 2.2.1-1 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Sensibilisierungs- und Effektorphase.

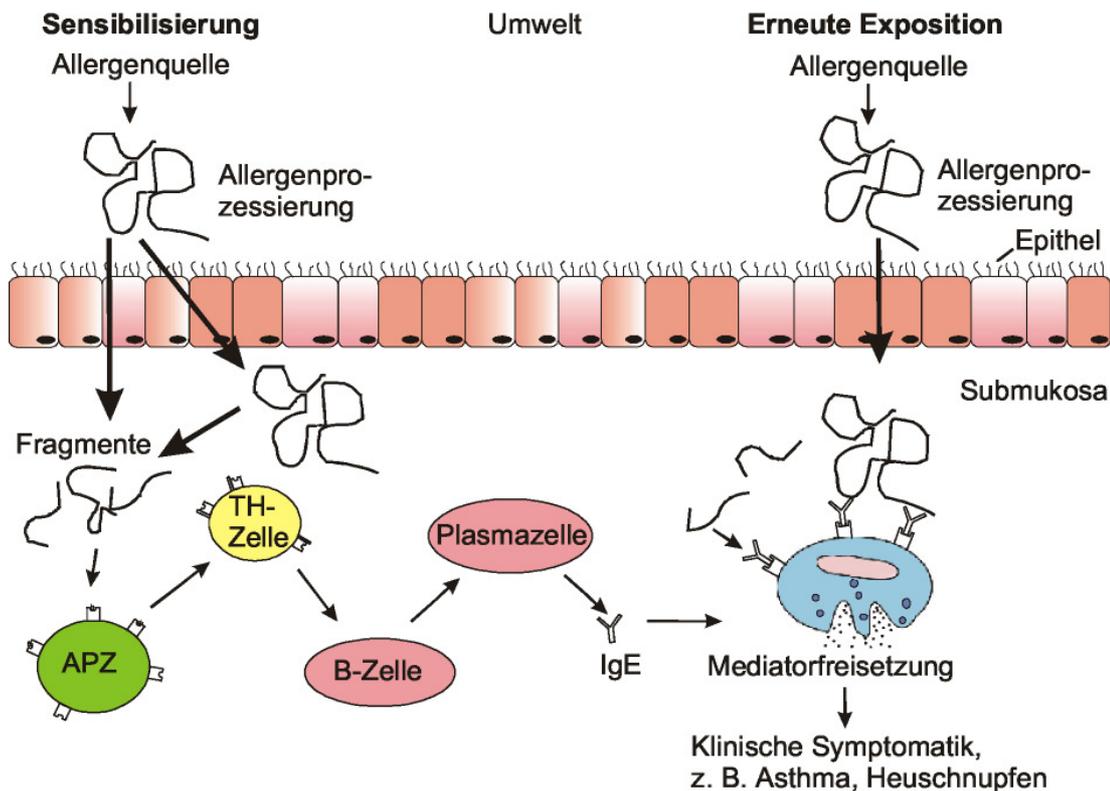


Abb. 2.2.1-1: Pathomechanismus der Typ I-Allergie (verändert nach Holgate et al., 1996) [Holgate, S. T., M. K. Church, and A. Kapp. (1996). *Allergologie*. Ullstein Mosby, Wiesbaden, Deutschland: pp. 1-326.]

APZ = Antigenpräsentierende Zelle; B-Zelle = B-Lymphozyt;

IgE= Immunglobulin E; TH-Zelle = T-Helferzelle.

Nach Eintritt des Allergens in den Körper wird es von ortsständigen Makrophagen, dendritischen Zellen, Langerhans- oder B-Zellen, die hier als antigenpräsentierende Zelle (APZ) wirken, aufgenommen und enzymatisch in kleinere Peptide gespalten. Diese Peptide werden anschließend auf der Zelloberfläche als sog. T-Zellepitope zusammen mit einem MHC-II-Protein (*major-histocompatibility complex*) präsentiert. Ein spezifischer T-Zellrezeptor erkennt das Peptid und führt in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu zur weiteren Differenzierung der T-Lymphozyten (T-Zelle) in T-Helferzellen vom Typ 1 oder Typ 2 (TH1- und TH2-Zellen), wie in Abb. 2.2.1-2 dargestellt.

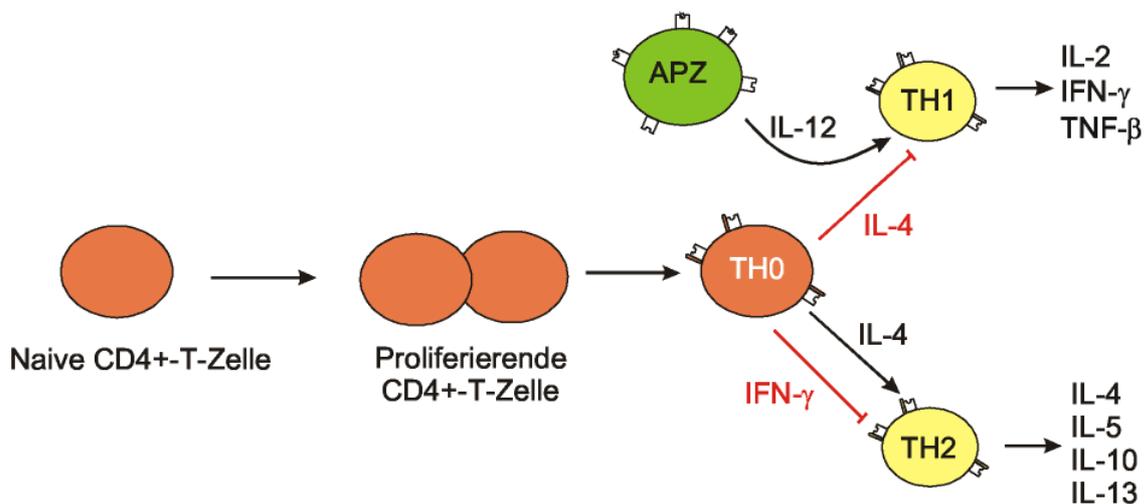


Abb. 2.2.1-2: Entwicklungsstadien von CD4+-T-Zellen.

APZ = Antigen-präsentierende Zelle; B-Zelle = B-Lymphozyt;

IgE = Immunglobulin E; IL = Interleukin; IFN-γ = Interferon- γ ;

TH-Zelle = T-Helferzelle; TNF-β = Tumornekrose Faktor-β.

Bei der Sensibilisierung mit bestimmten Allergenen, wie z.B. Pollenallergenen, kommt es zur Bildung von Th2-Zellen. Diese führen unter Einfluß von Interleukinen (u.a. IL-4, IL-13) zur Differenzierung von spezifischen B-Lymphozyten zu Plasmazellen. Darüberhinaus bewirkt die Stimulierung mittels IL-4 und IL-13 den Isotypenwechsel der Immunoglobulinklasse von IgM zu IgE [van der Stoep et al. 1994]. Diese IgE-Moleküle sind in der Lage, mit ihrem Fc-Teil an

den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) von Mastzellen oder basophilen Granulozyten zu binden [Metzger, H. et al. 1982]. Die einmal begonnene Produktion von IgE-Antikörpern dauert über Monate an [Blaser, K. 1993].

Die Zweitexposition leitet innerhalb von Sekunden eine Überempfindlichkeitsreaktion ein, die mit klinischen Symptomen auch äußerlich in Erscheinung tritt. Die (mindestens zwei) Epitope des Allergens binden sich an Paratope des zellständigen Antikörpers. Werden zwei IgE-Moleküle von einem polyvalenten Allergen überbrückt, zieht es die beiden anhaftenden IgE-Rezeptoren aufeinander zu und aktiviert dadurch auf direktem oder indirektem Weg verschiedene Enzyme in der Zellmembran. Kaskaden chemischer Reaktionen, an denen Tyrosinkinasen, Phospholipase C, Proteinkinase C und der Einstrom an Kalzium-Ionen beteiligt sind, bewirken die sog. Exozytose. Hierunter versteht man einen Prozeß der Ausschüttung vorgefertigter Mediatoren wie Histamin aus speziellen zellulären Kompartimenten, den sog. Granula. Die Granula wandern zur Plasmamembran, fusionieren mit ihr und öffnen sich, um ihre Inhaltsstoffe auf die Außenseite der Zelle zu entladen. Dieser Prozeß wird als Degranulation bezeichnet [Kagey-Sobotka, A. et al. 1982]. Die damit verbundenen biologischen Vorgänge, wie gesteigerte Gefäßdurchlässigkeit, Vasodilatation, Kontraktion der glatten Muskulatur und Sekretion von Schleimdrüsen bewirken die Sofortreaktion der Typ I-Allergie, die in den ersten 15-30 Minuten nach Allergenkontakt eintritt. Die Verbindung der FcεRI-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche bewirkt aber über weitere intrazelluläre Signalkaskaden die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie Prostaglandinen und Leukotrienen [Holgate, S. und Church, M. 1993]. Unter dem Einfluß dieser Mediatoren erfolgt die vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, sowie die chemotaktische Anlockung von Entzündungszellen, wodurch es im Zeitabschnitt 6-12 Stunden nach Allergenkontakt (Spätphase der IgE-Antwort) zu einer zunehmenden Gewebsinfiltration mit neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie mononukleären Zellen kommt (vgl. auch Zelladhäsionskaskade). Dieser Mechanismus kann nach erfolgter Sensibilisierung durch minimale Allergenmengen ausgelöst werden.

## 2.3 Pollen als Allergenträger

Neben Pilzsporen und Säugetierepithelien stellen Pollen die häufigsten Aeroallergene natürlichen und anthropogenen Ursprungs der Außenluft dar. Die Menschen kennen Pollen schon seit Jahrtausenden. Die ersten bekannten Aufzeichnungen finden sich in prähistorischen Kunstwerken im Palast syrischer Könige 800 v. Chr. Der Name „Pollen“ wurde vom schwedischen Naturforscher Linnaeus [Knox, R. B. 1979] bereits 1760 geprägt und leitet sich vom lateinischen Wortstamm „*pollos*“ ab, der ursprünglich „sehr feines Mehl“ bedeutete [Schubert, R. und Wagner, G. 1993]. Im Griechischen heißt „*pollós*“ „viel“, was gut mit der großen Anzahl freigesetzter Pollenkörner übereinstimmt.

Aus Sicht der Pollenkunde (Palynologie) sind Pollen Träger des männlichen Erbguts höher entwickelter Pflanzen („Gametophyt“) und damit für deren sexuelle Reproduktion essentiell. Sie sind zwischen 5 und 80  $\mu\text{m}$  groß [SRU (Rat von Sachverständigen für Umweltfragen) 1998] und besitzen eine widerstandsfähige zweischichtige Hülle [Stanley, R.G. und Linskens, H.F. 1985], bestehend aus einer inneren Intine aus den Zellwandmaterialien Zellulose und Pektin und einer extrem widerstandsfähigen äußeren Exine, welche aus Sporopollenin gebildet wird, das die Zellen vor physikalischen wie auch enzymatischen Einflüssen schützt [Shaw, G. 1971]. Die Intine umschließt das Zytoplasma des Pollens mit allen Zellorganellen, einschließlich eines vegetativen und eines generativen Zellkerns, Stärke-Granula und Polysaccharid-Partikeln. Der besondere Aufbau dieser Doppelhülle ermöglicht es den Pollen, zumindest in trockener Umgebung, Jahrhunderte vital zu überdauern.

Aus allergologischer Sicht dagegen gehören Pollen, neben Pilzsporen und Säugetierepithelien, zu den wichtigsten Allergenquellen der Außenluft. Naturgemäß spielen in diesem Zusammenhang windbestäubte (amenophile) Pflanzen die Hauptrolle, da ihre Pollen schon durch geringste Luftbewegung über größere Entfernungen transportiert werden können [Behrendt, H. und Becker, W.-M. 2001], [Ring, J. und Krempf-Lamprecht, L. 1987].

Einen Kausalzusammenhang zwischen Pollenexposition und dem Auftreten

allergischer Symptome hatte erstmals vor fast 130 Jahren Blackley hergestellt [Blackley, C.H. 1959]. Der an Heuschnupfen leidende Arzt konnte die Symptome der Rhinokonjunktivitis sowie asthmatische Beschwerden hervorrufen, indem er sich Pollen in eine Kratzwunde rieb. Erst 90 Jahre später wurde von Johnson und Marsh die biochemische Struktur des Gruppe 1-Allergens aus Gräserpollen aufgedeckt [Johnson, P. und Marsh, D.G. 1965]. Heutzutage ist allgemein anerkannt, daß spezifische Proteine - die Allergene - aus Pollen zur Sensibilisierung, wie auch zum Ausbruch allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale, allergischer Rhinitis und Konjunktivitis führen können. Allergene sind für gewöhnlich Proteine oder Glykoproteine mit einer Masse zwischen 5 und 60 kDa [Sonenthal, K. R. und M. A. Shaughnessy 1993]. Sie sind wasserlöslich und können bei Kontakt der Pollen mit der menschlichen Schleimhaut innerhalb von Sekunden freigesetzt werden [Shou, C. 1995].

Identifizierte Allergene werden nach der offiziellen Nomenklatur der WHO mit den ersten drei Buchstaben des wissenschaftlichen Gattungsnamens, dem ersten Buchstaben des Artnamens und einer laufenden, chronologisch vergebenen Nummer bezeichnet [WHO/IUIS (Allergen Nomenclature Subcommittee) 1994]. Das Gruppe 1-Allergen aus den Pollen des Wiesen-Lieschgrases (*Phleum pratense* L.) wird demnach als Phl p 1 bezeichnet. Bei diesem Allergen handelt es sich um ein 31-36 kDa großes Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 5 % [Petersen, A. et al. 1995a].

Sie wirken als Antigene und besitzen die Fähigkeit, eine IgE-vermittelte Immunantwort zu induzieren [D'Amato et al. 1998]. Als Voraussetzung hierfür müssen die Allergene mindestens zwei IgE-reaktive Epitope aufweisen, damit es die Verbindung zweier IgE-Moleküle über den FcεRI-Rezeptor zur Degranulation von Mastzellen und Basophilen kommen kann.

Anhand der Wirkung auf ein untersuchtes Patientenkollektiv werden die natürlichen Allergene üblicherweise näher klassifiziert. Verursachen sie bei über 50% der Patienten eine Reaktion mit Allergen-spezifischen IgE-Antikörpern, so werden sie als Majorallergen bezeichnet. Reagieren weniger als die Hälfte der Patienten, spricht man von einem Minorallergen [WHO/IUIS (Allergen

*Nomenclature Subcommittee) 1994].*

Die Frage, warum einige Allergene in ihrer Fähigkeit, eine spezifische IgE-Antwort hervorzurufen, potenter sind als andere, ist jedoch bislang auf molekularer Ebene wenig verstanden. Allergene von Birken- oder Gräserpollen haben beispielsweise eine deutlich höhere allergene Potenz als die von Kiefernpollen. Von den mehr als 20 % der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern, die unter einer Typ I-Überempfindlichkeit leiden, zeigt ein großer Teil eine Allergie gegen Gräserpollen [Tamborini, E. et al. 1995]. Allergien gegen Kiefernpollen dagegen, treten trotz der erheblichen Menge an Kiefernpollen in der Außenluft im Frühsommer in Mitteleuropa nur extrem selten auf.

Abgesehen von der molekularen Struktur der Allergene ist in diesem Zusammenhang auch die Bioverfügbarkeit von Bedeutung, d.h. die Allergenmenge, die aus den Pollen überhaupt freigesetzt wird. Wie von Grote et al. beschrieben, sind die Allergene vorwiegend im Pollen lokalisiert, d.h. im Zytoplasma, in Ribosomen-reicher Umgebung [Grote, M. 1999], aber auch in Mitochondrien, Polysaccharid-Partikeln und Stärkegranula wurden Allergene bereits nachgewiesen [Behrendt, H., Becker, W. M. 2001]. In trockener Umgebung sind Pollen sehr stabil und Allergene können über Jahrhunderte in Pollen vorhanden sein [Stanley, R. G. und Linskens, H. F. 1985].

Dagegen kommt es unter feuchten Bedingungen, wie beim Auftreffen der Pollen auf die Blütennarbe, aber auch bei Schleimhautkontakt zur Wasseraufnahme und zum physiologischen Prozeß der Quellung. Bei der anschließenden Keimung, also dem Austritt des Pollenschlauchs, werden aus dem Zytoplasma Reservestoffe, wie Fette, Kohlenhydrate und Proteine, darunter auch die Allergene, mobilisiert.

Darüberhinaus ist unter bestimmten Bedingungen auch eine direkte Allergenfreisetzung in die Umgebungsluft möglich. Sie wird begünstigt durch hohe relative Luftfeuchtigkeit, Gewitter und Luftverschmutzung v.a. durch Straßenverkehr [Behrendt, H., Becker, W. M. 2001]. Wie Behrendt et al. außerdem zeigen konnten, ist die Freisetzung von Allergenen temperatur-, zeit- und pH-abhängig. So wurde das Maximum der Gesamtproteinfreisetzung von Birken-, Gräser- und Kiefernpollen bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von

9,0 erreicht, während die größte Menge an den Majorallergenen Bet v 1 und Phl p 5 bei einem pH-Wert von 7,4 abgegeben wurde [Behrendt, H. et al. 1999].

### 2.3.1 Proinflammatorische Substanzen aus Pollen

Pollen sind als Allergenträger klar identifiziert worden. Abgesehen davon gibt es verschiedene Hinweise dafür, daß Pollen auch mit im Respirationstrakt ortsständigen Zellen des innaten Immunsystems, wie Alveolarmakrophagen, dendritischen Zellen oder auch neutrophilen und eosinophilen Granulozyten interagieren. Derartige Effekte beschrieben Siegel und Shermann bereits in den Siebzigerjahren, nachdem sie in Modellversuchen mit Meerschweinchen zeigen konnten, daß Beifußpollen bei Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten Adhärenz und morphologische Veränderungen bewirkten [Siegel, I. und Shermann, W.B. 1970].

Lindberg et al. konnten zeigen, daß sich die Adhärenz von Pollen und Leukozyten durch Zugabe von Serum dosisabhängig erhöhen ließ [Lindberg, R.E. et al. 1982]. Dieser Befund wurde später durch die Entdeckung erklärt, daß Serumtransferrin als Granulozyten-Pollen-Bindungsprotein fungiert [Sass-Kuhn, S.P. et al. 1984], [Mackay, J.A. 1986]. Bei Untersuchungen der Interaktion von Pollenkörnern mit Entzündungszellen, konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, daß Pollenkörner (Birke und Gräser) auch unter serumfreien Bedingungen an Granulozyten adhärten, im Zuge dessen es auch zur Freisetzung von Granulaproteinen, wie Myeloperoxidase (MPO) aus Neutrophilen und *eosinophilic cationic protein* (ECP) aus Eosinophilen kam [Kasche, A. et al. 2000], [Plötz, S. et al. 2004]. Im Rahmen dieser Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde allerdings noch ein weiterer interessanter Befund erhoben. So konnte gezeigt werden, daß Pollen unter feuchten Bedingungen, neben dem Allergen, auch weitere den Eikosanoiden ähnliche Stoffe freisetzen. Wässrige Pollenextrakte zeigten Kreuzreaktionen sowohl im Leukotrien B<sub>4</sub>- (LTB<sub>4</sub>) als auch im Prostaglandin E<sub>2</sub>- (PGE<sub>2</sub>) ELISA [Behrendt, H. et al. 2001]. Auch die zur näheren Charakterisierung Inhaltsstoffe durchgeführte HPLC (High Pressure Liquid

Chromatographie = Hochleistungs-Flüssigchromatographie) der Extrakte ergab ein „Peak“-Muster, das morphologisch mit dem bekannten Muster von LTB<sub>4</sub>- bzw. PGE<sub>2</sub>- Fraktionen nahezu übereinstimmte. Allerdings kann es sich bei den freigesetzten Substanzen nicht um LTB<sub>4</sub> bzw. PGE<sub>2</sub> selbst handeln, da deren Vorläufersubstanz Arachidonsäure in pflanzlichen Zellen nicht vorhanden ist. Eine wichtige Vorläufersubstanz für den Fettstoffwechsel von Pflanzen ist stattdessen die Linolsäure, die, wie in tierischen Zellen, über eine Lipoxygenase oder über Autooxidation (Abb. 2.3.1-1) verstoffwechselt wird [Feussner, I. et al. 1998]. Mittels HPLC wurden große Mengen an Linolsäure und deren Derivate in Birkenpollenextrakten nachgewiesen. Ein Produkt der Linolsäure, das über die 13-Lipoxygenase gebildet wird, ist die 13-Hydroxyoktadekadiensäure (13-HODE). Diese auch in den Pollenextrakten vorhandene Substanz ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, da für diese Substanz sowohl chemotaktische [Henricks, P. A. et al. 1991] als auch degranulationsfördernde [Van de Velde, M. J. et al. 1995] Wirkungen auf PMN bereits beschrieben wurden. Analog zu den in tierischen Zellen in der Zyklooxygenasereaktion aus der Arachidonsäure gebildeten Prostaglandinen, werden in pflanzlichen Zellen aus der Linolsäure durch Autooxidation die sogenannten Isoprostane gebildet. Von Imbusch und Mueller [Imbusch, R. und Mueller, M. J. 2000] wurden in frischen Birkenpollen Isoprostane in großen Mengen mittels HPLC nachgewiesen.

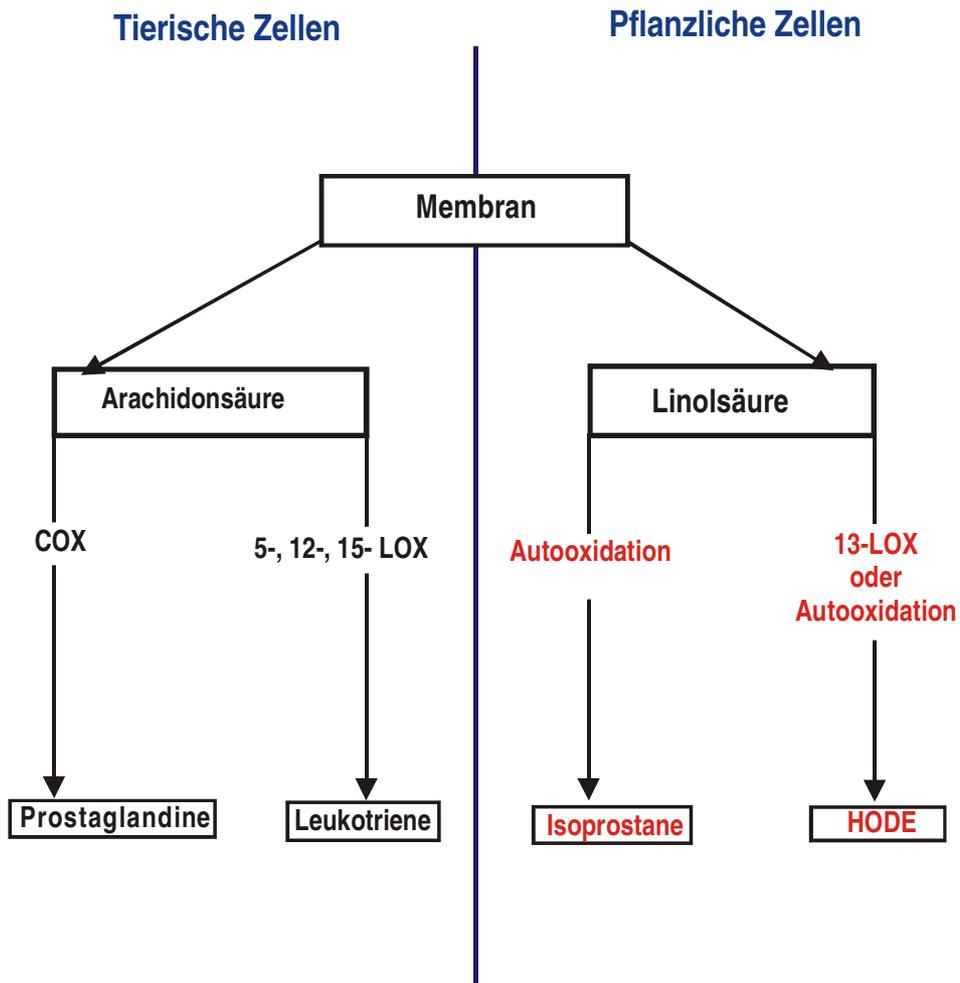


Abb. 2.3.1-1 Synthese von Leukotrienen bzw. Prostaglandinen aus tierischen Zellen und Isoprostanen bzw. HODE aus pflanzlichen Zellen.

In diesem Zusammenhang ist ein weiterer von unserer Arbeitsgruppe erhobener Befund [Behrendt, H. et al. 2001] besonders bemerkenswert, nämlich, daß Pollen von Pflanzen mit klinisch und epidemiologisch höherer allergener Potenz, wie Gräser, Birke und Beifuß, signifikant höhere Mengen dieser proinflammatorisch wirkenden Substanzen produzierten als Kiefernpollen, die als weniger allergen gelten. Die Menge der abgegebenen Stoffe war außerdem zeit-, pH- und temperatur- abhängig. Darüber hinaus wurden aus Pollen, die in der unmittelbaren Umgebung von Straßen mit hohem Verkehrsaufkommen gesammelt worden waren, größere Mengen dieser proinflammatorisch wirkenden Substanzen freigesetzt.

All diese Vorbefunde geben Grund zu der Annahme, daß Pollen über die

Freisetzung von Eikosanoid-ähnlichen Substanzen in IgE-unabhängiger Weise proinflammatorisch wirken könnten, indem sie Zellen des innate Immunsystems stimulieren. Dies könnte sowohl bei der Initialphase der Sensibilisierung als auch andererseits bei der Unterhaltung der allergischen Entzündung eine verstärkende Rolle spielen [Kasche, A. et al. 2000].

Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit die Effekte der Eikosanoid-ähnlichen Substanzen auf neutrophile Granulozyten genauer beleuchtet werden.

## **2.4 Wirkungsweise der Antihistaminika**

### **2.4.1 Klassische Wirkungsweise der Histamin1- Rezeptorblocker**

Antihistaminika sind seit den vierziger Jahren bei Patienten mit allergischer Rhinitis, Urtikaria und anderen allergischen Erkrankungen in der klinischen Anwendung. In den vergangenen Jahren wurden durch die Entwicklung neuer H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Fortschritte bei der Therapie allergischer Erkrankungen erzielt, die zum einen aus der Verminderung unerwünschter Wirkungen und zum anderen aus der verbesserten Pharmakokinetik und Wirksamkeit resultieren. Zur Behandlung der allergischen Rhinitis werden sie als Präparate der ersten Wahl empfohlen [Dykewicz, M.S. Et al. 1998], wobei die heute verfügbaren Substanzen zwar Niesreiz, Juckreiz und Rhinorrhoe wirksam bekämpfen, jedoch das Symptom der behinderten Nasenatmung nur unzureichend lindern können [Van Cauwenberge, P. 2000].

Der klassische Wirkmechanismus der Antihistaminika ist bedingt durch ihre Gemeinsamkeiten mit der chemischen Struktur des Histamins (Ethylaminseitenkette mit variierenden Substituenten), was eine kompetitive Wechselwirkung am Histaminrezeptor ermöglicht [Reider, N. et al. 1998a und b]. Auf diese Weise wird verhindert, daß das aus Mastzellen und basophilen Granulozyten freigesetzte Histamin seine Wirkung ausüben kann. Die

Hauptwirkung von Histamin am H1-Rezeptor ist die Tonussteigerung der glatten Muskulatur von Bronchien und Darm, sowie Gefäßpermeabilitäterhöhung. Weitere bekannte biologische Effekte von Histamin an ausgewählten Rezeptoren veranschaulicht Tabelle 2.4.1-1.

H2-Rezeptor	H1-Rezeptor + H2-Rezeptor	H3- Rezeptor
Magensäuresekretion ↑	Chemokinese von	Histaminsynthese in präsynaptischen Nervenzellen ↑
Pepsinsekretion ↑	Eosinophilen / Neutrophilen ↑	
Epithelpermeabilität der Bronchien ↑	<i>triple response</i> *	Bronchokonstriktion durch Neuropeptide und Cholinergika
Lymphozytäre Zytotoxizität ↑	Vasodilatation	
Neutrophilensekretion ↑	arterielle Hypotonie	Aktivierung von Lungenmastzellen
Basophilensekretion ↑	Kopfschmerzen	
B-Zell Differenzierung ↑	Flushphänomene	Ileumkontraktion und Magensäuresekretion (Meerschweinchen)
Antikörpersekretion von Plasmazellen ↑	Tachykardie	
cAMP-Spiegel ↑	positive Chronotropie	
positive Inotropie		
Arrhythmie		

**Tabelle 2.4.1-1:** Ausgewählte Rezeptortypen und biologische Effekte des Histamins.

\*) unter einer *triple response* (sog. Lewis-Trias) versteht man die Hautreaktion nach intrakutaner Histamininjektion: lokalisiertes Erythem durch Vasodilatation der Arteriolen, Bildung einer Quaddel durch erhöhte vaskuläre Permeabilität der Venolen mit umgebendem Reflexerythem durch Axonreflex-induzierte Vasodilatation; an Gefäßen mit einem Durchmesser > 80 µm wirkt Histamin vasokonstriktorisch.

Die Substanzen der ersten Generation zeichnen sich wegen hoher Lipophilie bei gleichzeitig geringer Rezeptorselektivität durch zahlreiche Nebenwirkungen aus, da sie die Blut-Hirn-Schranke passieren können, wodurch es zu Interaktionen mit den zentralen Histaminrezeptoren kommt. Es resultieren unerwünschte psychomotorische Wirkungen, wie Sedierung aber auch anticholinerge Effekte, wie Mundtrockenheit, Harnverhalt oder Tremor, was die Alltagstauglichkeit dieser Präparate sehr einschränkte. Aus diesem Grund wurden die Antihistaminika der zweiten Generation eingeführt. Diese Substanzen zeigten jedoch Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, insbesondere mit denjenigen, die um das Cytochrom P450 (Isotyp IIIA4), ein Hauptenzym des Fremdstoffmetabolismus in der Leber, konkurrieren [Simons, F.E. und Simons, K.J. 1999]. Darüber hinaus wurden diese Präparate auch mit kardialen Nebenwirkungen, wie insbesondere proarrhythmischen Eigenschaften in Verbindung gebracht [DuBuske, L.M. 1999].

Im Jahre 1998 wurde mit Fexofenadin (Telfast®) das erste Präparat der dritten Generation eingeführt, welches diese Nebenwirkungen nicht aufweist [Markham, A. und Wagstaff, A.J. 1998]. Weitere Vertreter der in Deutschland zugelassenen Antihistaminika der 3. Generation, sind in Tabelle 2.4.1-2 aufgeführt.

Freiname	Handelsname	Zulassung	Abbau
Fexofenadin	Telfast® 120, 180	SRA, U	biliär
Levoceterizin	Xusal®	SAR, U, PRA	Niere
Descarboethoxyl- loratadin	Aerius®	SRA, U, PRA	CYP 450

**Tabelle 2.4.1-2.** Antihistaminika der 3. Generation

Abkürzungen: SRA: saisonale Rhinitis allergica; PRA: perenniale Rhinitis allergica; U: Urticaria; CYP 450: Cytochrom P 450 der Leber

In dieser Arbeit soll dem neuen H<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker Desloratadin (Aerius®) besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Es ist in Deutschland für die Behandlung der allergischen Rhinitis und der chronischen idiopathischen Urtikaria zugelassen und hebt sich von anderen modernen Antihistaminika durch seine starke H<sub>1</sub>-Rezeptor-Affinität, seine pharmakokinetischen Eigenschaften sowie sein hervorragendes Sicherheitsprofil ab [Salmun, L.M. et al. 2000].

Viele der nichtsedierenden Antihistaminika werden bei ihrer Aufnahme in aktive und nichtaktive Metabolite umgewandelt. Im Gegensatz dazu ist Desloratadin bereits der primär aktive Metabolit seiner Vorläufersubstanz Loratadin (Lisino®). Verschiedene Studien ergaben, daß Desloratadin sowohl eine hohe Affinität wie auch hohe Selektivität für den H<sub>1</sub>-Rezeptor besitzt [Kreutner, W. et al. 2000], [Anthes, J.C. 2000], wodurch sowohl psychomotorische [Henz, B.M. et al. 2001] als auch anticholinerge und kardiale Nebenwirkungen minimiert wurden. Außerdem konnten Afrime et al. zeigen, daß seine Halbwärtszeit mit etwa 27 Stunden, verglichen mit Loratadin, bedeutend länger ist [Afrime M. et al. 2002], wodurch auch die erreichbare Konzentration der H<sub>1</sub>-Antihistaminika in der Haut, im Gewebe und im Plasma höher ist und die Applikation von 5mg einmal täglich ausreichend ist [Ring, J. et al. 2001].

#### **2.4.2 Antiallergische Zusatzwirkungen moderner Antihistaminika**

Neben dieser antagonistischen Wirkungsweise wurden für einige der modernen Antihistaminika antiallergische bzw. antientzündliche Effekte beschrieben, die sich nicht durch die alleinige Blockade der H<sub>1</sub>-Rezeptoren erklären ließen [Hoffmann, K. et al. 1999].

Dabei sind einige Substanzen der zweiten und dritten Generation partiell in der Lage, die Aktivität allergischer Effektorzellen zu supprimieren, wobei der Wirkungsmechanismus aber bislang nicht aufgeklärt ist. [De Vos, C. 1999], [Abdelaziz, M.M. et al. 2000], [Baroody, F.M. und Naclerio, R.M. 2000].

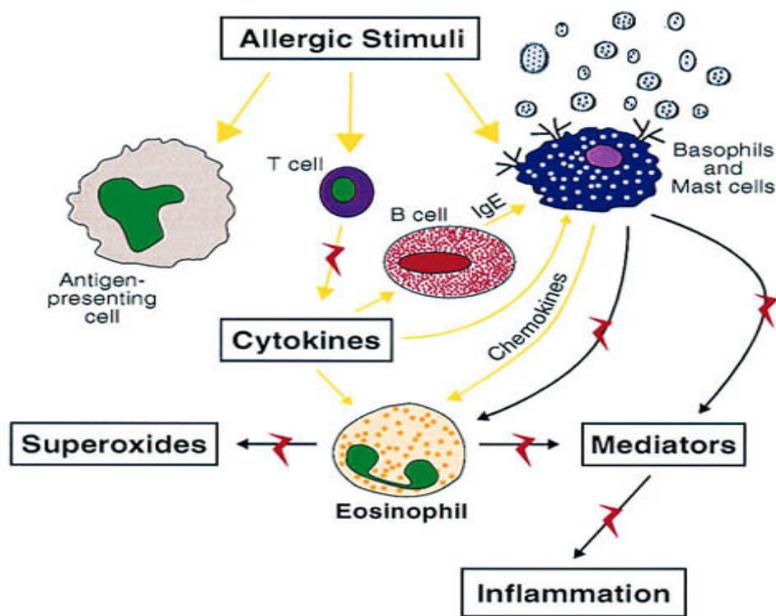


Abb. 2.4.2-1: Schematische Darstellung der wesentlichen Mechanismen allergischer Entzündungsreaktionen und mögliche Angriffspunkte antiallergischer Medikamente (rote Pfeile); [Geha, R.S., Meltzer, E.O., Desloratadine: A new, nonsedating, oral antihistamine; *J Allergy Clin Immunol* 107 (2001) 751-762].

In diesem Zusammenhang liegen bislang nicht zuletzt für Desloratadin verschiedene Arbeiten über antiallergische Zusatzwirkungen vor. Dabei ist besonders die Hemmung der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-4, IL-6, IL-8 und IL-13 zu erwähnen, welche für die Entstehung von nasaler Obstruktion, Entzündung, Rötung und Juckreiz verantwortlich sind [Lippert, U. et al. 2000]. Auch die Antigen-induzierte Histamin-Freisetzung aus Leukozyten wurde durch Desloratadin in einem Bereich zwischen 0,1  $\mu\text{mol/l}$  und 50  $\mu\text{mol/l}$  durchgehend dosisabhängig inhibiert [Kleine-Tebbe, J. et al. 1994]. Schroeder et al. konnten demonstrieren, daß Desloratadin in den Konzentrationen 100 nmol/L bis 10 $\mu\text{mol/L}$  *in vitro* neben der IgE-induzierten, auch die IgE-unabhängige IL-4- und IL-13 -Bildung von humanen Basophilen hemmt [Schroeder, J.T. et al. 2001]. Ähnliche Befunde wurden von Genovese et al. vorgelegt. Danach inhibiert Desloratadin 300nmol/L bis 100 $\mu\text{mol/L}$  die Freisetzung von Histamin, PGD<sub>2</sub>,

Leukotrien C<sub>4</sub>, Tryptase und dem TNF- $\alpha$  -induziertem Chemokin CCL5 von humanen basophilen Granulozyten [Genovese, A. et al. 1997].

Auch an anderen Zelltypen, die nicht zu den klassischen Effektorzellen der allergischen Reaktion gerechnet werden, wie z.B. nasale und bronchiale Epithelzellen, Endothelzellen, Keratinozyten konnte eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen durch Loratadin und Desloratadin nachgewiesen werden [Bousquet, J. et al. 1988]. In der Konzentration 10<sup>-5</sup> mol/L verminderte Desloratadin die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM, auf nasalen Epithelzellen [Vignola, A.M. et al. 1995]. Außerdem zeigten Agrawal et al., daß Desloratadin in Konzentrationen zwischen 10<sup>-7</sup> mol/L bis 10<sup>-5</sup> mol/L die PAF-induzierte Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten von Atopikern hemmt. [Agrawal, D.K. 2001].

Diese antiinflammatorischen Wirkungen von Desloratadin sollen auch Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit sein.

### 3 Problemstellung

Basierend auf Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe, daß Pollenkörner neben dem Allergen auch Eikosanoid-ähnliche Stoffe freisetzen [Behrendt, H. et al. 1999], [Behrendt, H. et al. 2001], soll in dieser Arbeit die biologische Aktivität dieser Substanzen exemplarisch an neutrophilen Granulozyten als Zellen des innate Immunsystems untersucht werden. Für die in der Vergangenheit bereits näher untersuchte Stoffgruppe der Eikosanoide selbst wurden u. a. bereits proinflammatorische, chemotaktische und immunmodulatorische Wirkungen für verschiedene Zelltypen des Immunsystems herausgestellt. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit zum einen eventuelle proinflammatorische Effekte dieser Substanzen auf neutrophile Granulozyten anhand der Parameter Chemotaxis, Expression von Adhäsionsmolekülen (CD11b), der Induktion des intrazellulären Kalziumflusses und der Freisetzung von zytotoxischen Enzymen (MPO) näher beleuchtet werden. Ließen sich entzündungsfördernde Wirkungen auf Neutrophile nachweisen, so könnte dies für eine mögliche Bedeutung dieser Substanzen für die Initiierung bzw. Aggravierung der allergischen Reaktion sprechen, woraus sich möglicherweise auch neue Ansätze für die Therapie allergischer Erkrankungen ergeben könnten.

Zum anderen sollte, durch Anwendung verschiedener Extrahierungsmethoden, versucht werden, die aus Pollen freigesetzten Substanzen näher zu charakterisieren. Hierfür wurde eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ivo Feußner von der Abteilung für Pflanzenbiochemie des Albrecht-von-Haller-Instituts für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität zu Göttingen begonnen. Da Eikosanoide durch enzymatischen Abbau aus der Arachidonsäure entstehen, die jedoch nicht in Pollen vorhanden ist, kann es sich bei den gefundenen Stoffen nur um Eikosanoid-ähnliche Substanzen handeln. Daher wird in diesem Zusammenhang besonderes Augenmerk auf die monohydroxylierten Linolen- und Linolsäurederivate wie HODE (Hydroxyoktadecadiensäure) und HOTE (Hydroxyoktadecatriensäure) gerichtet, da für diese Mediatoren, die in Pflanzen durch das Enzym 13-Lipoxygenase oder durch Autooxidation vermittelt entstehen

[Feussner, I. et al. 1998], bereits chemotaktische [Henricks, P. A. et al. 1991] und degranulationsfördernde [Van de Velde, M. J. et al. 1995] Wirkungen auf PMN beschrieben wurden.

Der zweite Teil dieser Arbeit sollte der Frage nachgehen, inwieweit das Antihistaminikum der dritten Generation Desloratadin neben antiallergischen auch antientzündliche Eigenschaften aufweist. Dabei wurde *in vitro* die Wirkung von Desloratadin auf neutrophile Granulozyten untersucht. Im einzelnen wurde hierfür der Einfluß auf die chemotaktische bzw. -kinetische Aktivität, die Regulation von Adhäsionsmolekülen (CD11b) und die Freisetzung von zytotoxischen Enzymen (MPO) näher beleuchtet.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Material**

#### **4.1.1 Probanden**

Die Auswahl der für die Studie geeigneten Probanden wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen. Verglichen wurden Atopiker mit Nicht-Atopikern.

Die Blutentnahmen erfolgten von freiwilligen Probanden, wobei Einschlusskriterium für Atopiker das Vorliegen von allergischer Rhinitis sowie die Sensibilisierung gegenüber Birkenpollenallergen mit spezifischem IgE für Birke der RAST-Klasse 2 oder mehr war. Dabei erfolgte die Quantifizierung des spezifischen IgE für Birkenpollen (t3) mittels Pharmacia CAP System FEIA (Pharmacia, Uppsala, Schweden).

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 keiner Kontrollperson

fanden sich Hinweise auf das Vorliegen einer atopische Diathese, deren Erkennung die Definition des Begriffs Atopie nach Ring [Ring, J. 1995] zugrunde lag.

Für alle Probanden wurden die Ausschlußkriterien Nikotinabusus, das Vorliegen eines akuten Infekts wie auch die Einnahme von antiallergischen Medikamenten, wie Antihistaminika, im Zeitraum einer Woche vor der Blutentnahme, definiert.

#### **4.1.2 Pollen**

Betula alba L. (Birkenpollen; 1998)	Allergon, Ängelholm, Schweden
Phleum pratense L. (Lieschgraspollen; 1997)	Allergon, Ängelholm, Schweden
Pinus sylvestris L. (Kiefernpollen; 1997)	Allergon, Ängelholm, Schweden

#### **4.1.3 Antikörper**

AnnexinV-FITC (BMS306FI)	Bender Med Systems, Wien, Österreich
Anti-CD11b/Mac-1 (clone ICRF44)	Becton Dickinson, San Jose, USA
IgG <sub>1a</sub> -Isotypenkontrolle	Becton Dickinson, San Jose, USA

#### **4.1.4 Geräte, Lösungen, Puffer**

##### **4.1.4.1 Chemikalien**

Albumin Standard (2 mg/ml)	Pierce / Rochford, Illin., USA
Aqua ad iniectabilia	Delta Select, Pfullingen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck, Deisenhofen
CELL-WASH	Becton Dickinson, Heidelberg

Desloratadin	Schering-Plough Research Inst., Kenilworth, NJ, USA
Ethanol absolut	Merck, Deisenhofen
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS (469x)	Invitrogen, Karlsruhe
Fluo-3 AM	Molecular Probes, Eugene, USA
Glycerin (87%)	Merck, Deisenhofen
Histopaque-1077	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Histopaque-1119	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
13-HODE	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
13-HOTE	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
LTB <sub>4</sub>	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
LY293111	Lilly, Greenfield, USA
MPO-RIA	Pharmacia, Uppsala, Schweden
NES AS	Invitrogen, Karlsruhe
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , ohne Mg, ohne H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumjodid	Bender MedSystems, Hamburg
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Sodium Pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA

#### 4.1.4.2 Puffer

FACS-Puffer:	500ml PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 5ml 2%iges NaAzid +12,5ml FCS 469x
RPMI-Standardmedium:	500ml RPMI 1640 ohne L-Glutamin + 5ml L-Glutamin 100x + 5,6ml NES AS + 5,6ml Natrium Pyruvat

#### 4.1.4.3 Verbrauchsmaterial

EDTA-Monovetten 9ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Tubes	Eppendorf, Hamburg
Falcon Polypropylen-Röhrchen 15 ml/50 ml	Becton Dickinson, Mountain View, USA
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren
Filterkarten für Zytokontainer	Schleicher & Schuell
Serum-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter (0,22 $\mu\text{m}$ )	Millipore GV/Eschborn
Transwell-Platten 24-well / 96-well	Corning Costar, MA, USA

#### 4.1.4.4 Geräte

FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	MC1 Research, Sartorius, Göttingen
Gammazähler LB2103	Berthold, München

Homogenisator	Ultra Turrax T 25 basic, IKA Werke, Staufen
Lichtmikroskop	Aristoplan, Fa. Leitz-Leica, Wetzlar
Multipette	Eppendorf, Hamburg
pH Meter	pH 537, WTW, Weilheim
Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Titramax 100, Heidolph, Schwabach
Waage	MC1Labor, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Typ 1003, GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Biofuge 13, Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Herstellung von Extrakten aus Pollen

#### 4.2.1.1 Herstellung von wässrigen Pollenextrakten

Zur Herstellung der wässrigen Pollenextrakte wurden 34 mg der jeweiligen Pollen (*Betula alba*- oder *Phleum pratense*-Pollen, Allergon, Ängelholm, Schweden) abgewogen, und mit RPMI complete + 0,5% BSA auf 1 ml aufgefüllt.

Diese Menge Pollen wurde als Richtwert verwendet, da, wie bereits weiter oben beschrieben, im ELISA bei 34 mg/ml *Betula alba* eine durchschnittliche Konzentration von  $3,9 \times 10^{-10}$  M LTB<sub>4</sub>-ähnlicher Substanz gemessen wurde, was der chemotaktisch wirksamen LTB<sub>4</sub>-Konzentration entspricht.

Nachdem die Pollenlösung gut homogenisiert wurde, inkubierte sie für 30 Minuten im 37°C warmen Schüttelwasserbad. Anschließend wurde die Lösung 10 Minuten lang bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugats wurde steril filtriert und es wurde zur späteren dosisabhängigen Stimulation der Granulozyten

eine Verdünnungsreihe mit RPMI- Standardmedium + 0,5% BSA hergestellt.

## **4.2.2 Herstellung von Lipidextrakten aus Pollen**

### **4.2.2.1 Herstellung von Lipidextrakten mittels Hexan-Isopropanol-Extraktion in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. I. Feußner**

Die oxidierten Fettsäuren 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE) und 13-Hydroxyoctatetraensäure (13-HOTE) wurden nach der Methode von Weichert et al. [Weichert, H. et al. 1999] 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 hinzugegeben. Die sofortige Homogenisierung erfolgte mit dem Ultra Turrax (T 25 basic, IKA-Werke, Staufen) für 30 Sekunden. Das Extrakt wurde 10 Minuten bei 4500 x g und bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 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.

### **4.2.2.2 Aufreinigung der Lipidextrakte mit Hilfe der RP-HPLC in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. I. Feußner**

Die HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie = Hochleistungs-Flüssigchromatographie) [Matsui, K. et al. 2000] wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ivo Feußner von der Abteilung Biochemie der Pflanze des Albrecht-von-Haller-Instituts für Pflanzenwissenschaften im Göttinger Zentrum für Molekulare Biowissenschaften vorgenommen. 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, wobei hier die HPLC, also Flüssigkeitschromatographie mit einem Agilent 1100 HPLC System durchgeführt wurde. Zunächst wurden die oxidierten Fettsäuren mittels Reverse Phase (RP)-HPLC aufgereinigt, wofür entweder eine ET250/2 Nukleosil 120-5 C18 Säule (Macherey-Nagel, 2,1 x 250 mm, 5- $\mu$ m Partikelgröße) für Analysezwecke oder eine ET250/2 Nukleosil 250/2 Nukleosil 250-5 C18 Säule (Macherey-Nagel, 4,6 x 250 mm, 5- $\mu$ m Partikelgröße) für Präparationszwecke mit einem Lösungsmittelsystem aus Methanol / Wasser / Essigsäure (85 : 15 : 0,1) und einer Flußrate von 0,18 ml x min<sup>-1</sup> verwendet wurde. Die vorwärts gerichtete HPLC der Hydro(pero)xy-Fettsäuren wurde an einer Zorbax Rx-SIL Säule (Agilent, 150 x 2,1 mm, 5- $\mu$ m Partikelgröße mit einem Lösungsmittelsystem aus *n*-Hexan / Isopropanol / Essigsäure (100 : 1 : 0,1) und einer Flußrate von 0,1 ml x min<sup>-1</sup> durchgeführt. Für die Chiral-Phase-HPLC der Hydro(pero)xy-Fettsäuren wurde eine Chiralcel OD-H Säule (Daicel, 150 x 2,1 mm) mit einer 5- $\mu$ m Partikelgröße und einem Lösungsmittelsystem aus *n*-Hexan / Isopropanol / Essigsäure (100 : 5 : 0,1) verwendet. Die gewählte Flußrate betrug 0,1 ml x min<sup>-1</sup>. Die Absorption der konjugierten Diensysteme wurde bei 234 nm überwacht. Als interner Standard diente (13S, 6Z, 9Z, 11E)-13-hydroxy-6,9, 11- oktadekatriensäure. Durch die HPLC-Aufreinigung konnte die nähere Charakterisierung der Lipid-extrakte hinsichtlich ihres Gehaltes an den bereits weiter oben beschriebenen Leukotrien-ähnlichen Substanzen 13-HODE und 13-HOTE erfolgen.

Die Herstellung der Extrakte war in zwei Schritten erfolgt. Zunächst wurden Fettsäuren relativ unspezifisch mittels Hexanisopropanol-Isolation gewonnen. Die so erzeugten Extrakte wurden nachfolgend als „HIP“-Extrakte bezeichnet. In einem weiteren Schritt wurden diese HIP-Extrakte mittels *Reverse Phase* (RP)-HPLC weiter aufgereinigt, so daß nach dieser Prozedur in den sog. RP-Phase-Extrakten v.a. monohydroxylierte Fettsäuren verblieben.

(siehe Tab. 4.2.2.2-1 und 4.2.2.2-2)

<b>Betula alba</b>	HIP-Extrakt	RP-Phase
13-HODE [ng/μl]	0,86	0,86
13-HOTE [ng/μl]	0,20	0,20

**Tab. 4.2.2.2-1:** Konzentrationen von 13-HODE und 13-HOTE in Hexan-Isopropanol-Extrakten (HIP-Extrakt) und *Reverse-Phase*-HPLC (RP-Phase) von *Betula alba*

<b>Phleum pratense</b>	HIP-Extrakt	RP-Phase
13-HODE [ng/μl]	31,9	36,8
13-HOTE [ng/μl]	41,5	48,5

**Tab. 4.2.2.2-2:** Konzentrationen von 13-HODE und 13-HOTE in Hexan-Isopropanol-Extrakten (HIP-Extrakt) und *Reverse-Phase*-HPLC (RP-Phase) von *Phleum pratense*

#### 4.2.3 Isolation von neutrophilen Granulozyten (PMN)

Die Isolation der PMN erfolgte aus dem Vollblut der Probanden mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Histopaque-1119 und Histopaque-1077 (jeweils Sigma Diagnostics, Deisenhofen). Diese aus Polysaccharose und einem Kontrastmittel bestehenden Lösungen wurden, basierend auf Erkenntnissen von English und Andersen [English, D. und

*Anderson, B.R. 1974*], für diesen Zweck entwickelt.

Nach der Abnahme in 9ml- EDTA-Monovetten [1,6mg EDTA je ml Blut] wurden 40 ml Vollblut je Proband zu gleichen Teilen auf zwei 50ml-Polypropylen-Falcon-Röhrchen aufgeteilt und vorsichtig mit 13 ml Histopaque-1077 unterschichtet. Darauf folgte die Unterschichtung dieser beiden Phasen mit Histopaque-1119 mit einer 20 ml-Einwegpipette. Anschließend wurden die Röhrchen bei 20°C für 45 min. bei 754 x g in einer Megafuge 1.0R (1900 rpm) zentrifugiert. Die Bande der polymorphonukleären Zellen befindet sich nach der Zentrifugation zwischen Histopaque-1077 und Histopaque-1119 (siehe *Abb. 4.2.2-1*). Diese Bande wurde mittels einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und in einem weiteren 50 ml Polypropylen-Röhrchen resuspendiert und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt. Nach diesem ersten Waschschrift und Zentrifugation bei 409 x g (1400 rpm) und 20°C für 10 Minuten wurde ein hypotoner Schock mit 5 ml sterilen Aqua ad iniectabilia durchgeführt, um vereinzelt in der Zellsuspension befindliche Erythrozyten selektiv zu lysieren. Nach 20 Sekunden erfolgte die Wiederherstellung der physiologischen Osmolarität durch Zugabe von 5 ml steriler 1,8% -iger Kochsalzlösung. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 353 x g (1300 rpm) und 20°C erfolgte ein dritter Waschschrift mit Resuspension des Pellets in 5 ml PBS. Nach erneuter Zentrifugation bei 301 x g (1200 rpm), unter sonst gleichen Bedingungen, wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 10 ml RPMI - Standardmedium + 0,5% BSA aufgefüllt. Im Anschluß daran erfolgte unter dem Lichtmikroskop die Bestimmung der Konzentration der PMN pro ml Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer sowie die Kontrolle der Vitalität der Zellen. Hierfür wurde der Zellsuspension ein Aliquot von 10 µl entnommen und mit 90 µl Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt. Da die Membran intakter Zellen für den Farbstoff undurchlässig ist, gelingt eine selektive Anfärbung avitaler Zellen. Entsprechend der bestehenden Zelldichte wurde die Konzentration der PMN durch Zugabe von RPMI auf  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt.

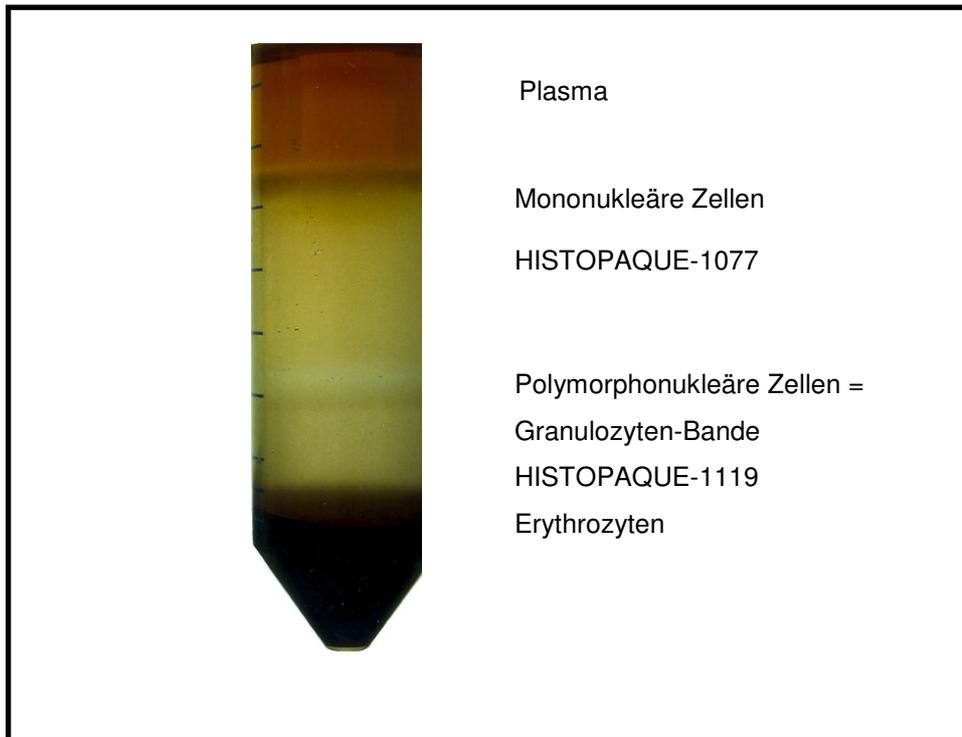


Abb. 4.2.3-1 Isolierung der neutrophilen Granulozyten durch Verwendung von zwei Dichtegradienten (Histopaque-1077 und Histopaque-1119).

#### 4.2.3.1 Vorinkubation von neutrophilen Granulozyten mit Desloratadin

Um den Einfluß von Desloratadin auf die Effektorfunktionen von Neutrophilen zu untersuchen, wurden diese folgendermaßen vorbehandelt.

Der Wirkstoff Desloratadin, der ein Molekulargewicht von 310,8 besitzt, wurde uns freundlicherweise von der Firma Schering in Form eines feingranulären Pulvers zur Verfügung gestellt. Nach dem Abwiegen des Pulvers, wurde es zunächst in 1ml Ethanol in einem 1,5 ml- Eppendorfröhrchen gelöst. Aus dieser Lösung wurde als nächstes mit PBS eine Verdünnungsreihe mit Standardlösungen der Konzentrationen D(I): [10.000 $\mu$ M], D(II): [1.000 $\mu$ M], D(III): [100 $\mu$ M] und D(IV): [10 $\mu$ M] hergestellt. Diese Standardlösungen wurden bis zu ihrer Verwendung auf

Eis gelagert. Da Ethanol als Lösungsmittel fungierte und um auszuschließen, daß die zu beobachtenden Effekte durch das Lösungsmittel hervorgerufen wurden, wurde analog eine Verdünnungsreihe der verwendeten Ethanolkonzentrationen [1 : 5] bis [1 : 500] hergestellt, die ebenfalls auf Eis gelagert wurde. All diese Standardverdünnungen wurden gut homogenisiert und dann mit der wie oben beschrieben hergestellten Zellsuspension im Verhältnis der jeweiligen Desloratadin-Lösung : Zellsuspension gleich 1 : 10 verdünnt, so daß die Endkonzentrationen [D1] bis [D4] [1.000µM] bis [1µM] betragen. Mit den Ethanolkontrollen wurde analog verfahren. Die mit Desloratadin versetzten Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

#### **4.2.3.2 Vorinkubation der neutrophilen Granulozyten mit einem selektiven LTB<sub>4</sub>-Rezeptor Antagonisten (LY293111)**

Zur Untersuchung der Wirkung der Lipidmediatoren und wässrigen Pollenextrakte auf neutrophile Granulozyten unter Blockierung des LTB<sub>4</sub>-Rezeptors, wurden die neutrophilen Granulozyten [ $1 \times 10^6$ /ml] 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad mit verschiedenen Konzentrationen [4 - 40000nM], des selektiven Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten LY293111 (Lilly, Greenfield, USA) vorinkubiert, wobei PBS als Lösungsmittel für die LY-Verdünnungsreihe fungierte. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Pollenextrakten.

#### **4.2.4 Transwell-Migrationsassay**

Zur Untersuchung der Migration der aus dem Vollblut isolierten neutrophilen Granulozyten (vgl. 4.2.4) wurde ein Zweikammersystemsystem (24 Well Mikrotiter-Platten von Costar, Bodenheim mit Polycarbonat-Membraneinsätzen) verwendet. Die Teilung der 24-Wellplatten in je zwei Kammern gelingt durch Membraneinsätze, die 5µm durchmessende Poren aufweisen, die von den PMN mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 10µm nur nach Aktivierung mit

entsprechender Veränderung der Morphologie durchdrungen werden können. (vgl. 4.2.4-1). Als Stimuli wurden sowohl wässrige, als auch Lipidextrakte verschiedener Pollenarten verwendet.

Als Positivkontrolle diente das für Neutrophile klassische Chemoattraktanz LTB<sub>4</sub> (Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA). Als Negativkontrolle wurde anstelle eines Aktivators RPMI-Standardmedium + 0,5% BSA verwendet. Das Verhältnis der Anzahl der migrierten Zellen und der Mediumkontrolle wird als Migrationsindex bezeichnet. Man spricht von einer signifikanten Migration, wenn dieser Index >2 ist. Für die Beschreibung des Migrationsverhaltens ist weiterhin von Bedeutung, ob die Migration entlang eines positiven oder eines negativen Konzentrationsgradienten einer chemotaktisch wirksamen Substanz verläuft. Wandern die Zellen entlang des positiven Gradienten, so spricht man von gerichteter Migration oder auch Chemotaxis. Die Zellwanderung entlang eines negativen Gradienten wird als ungerichtete Migration oder Chemokinese bezeichnet.

Um sowohl den Einfluß auf die gerichtete als auch die ungerichtete Migration zu analysieren, wurden die in Abb 4.2.4-1a) und b) aufgezeigten Versuchsansätze herangezogen. Dabei wurden für die Untersuchung der Chemotaxis jeweils  $1 \times 10^5$  PMN, gelöst in 100µl RPMI-Standardmedium + 0,5% BSA, in die obere Kammer pipettiert. Die untere Kammer wurde jeweils mit 600 µl der zu untersuchenden potentiell chemotaktisch wirksamen Substanzen verschiedener Konzentrationen befüllt. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivatorsubstanz für die Untersuchung der Chemokinese, also der ungerichteten oder „*random*“- Migration den Zellen in die obere Kammer hinzugegeben, während in die untere Kammer lediglich 600 µl RPMI-Standardmedium + 0,5% BSA pipettiert wurden.

Die Transwell-Platten inkubierten sodann für 90 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Nach dieser Zeit wurden 300µl der in der unteren Kammer entstandenen Zellsuspension in spezielle Zytometer-Röhrchen überführt, um die Zahl der durch die Membran transmigrierten Zellen mittels Durchflußzytometrie zu quantifizieren.

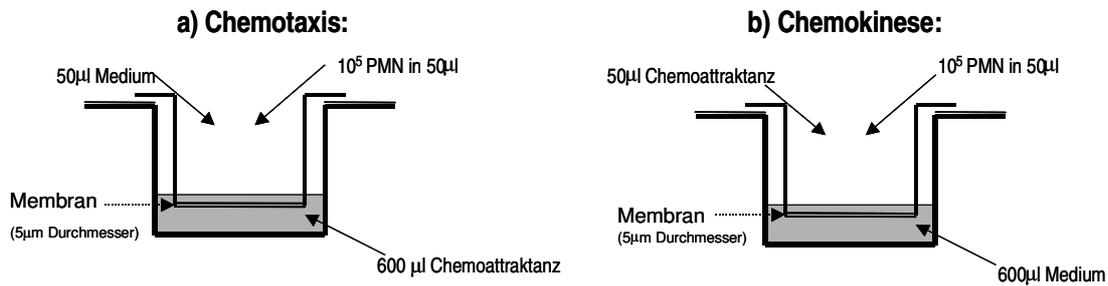


Abb. 4.2.4-1: Untersuchung der Migration mit Transwell-Platten

#### 4.2.5 Prinzip der Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein optisches Meßsystem zur schnellen und objektiven phänotypischen Charakterisierung von Zellpopulationen. Es basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d.h. der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen und bietet neben der Quantifizierung von Zellen einer Subpopulation in einer Zellsuspension zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten. So können u.a. funktionelle Untersuchungen von Aktivierungszuständen anhand der Hochregulierung von Oberflächenmolekülen durchgeführt oder intrazelluläre Stoffwechselforgänge, wie z.B. den intrazellulären Kalziumfluß, beobachtet werden. Eine weitere für diese Arbeit genutzte Funktion war die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen.

Für die Analyse im Durchflußzytometer wird ein ständiger Fluß einer Trägerflüssigkeit erzeugt, in welcher die Zellen über einen definierten Zeitraum mit einer definierten Fließgeschwindigkeit durch monochromatisches Licht, im Falle des für diese Arbeit verwendeten FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durch Argon-Laserlicht der Wellenlänge 488nm geführt werden. Mit Hilfe eines Mantelstroms werden die Zellen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung in Einzelzellsuspension hintereinander durch das Laserlicht geführt, weshalb synchron Größe, Granularität und Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle

analysiert werden kann.

Um Aussagen über Größe und Granularität machen zu können, wird das Streulicht, das beim Durchtritt der Zellen durch das Laserlicht entsteht, von verschiedenen Detektoren registriert. Die Intensität des von den Zellen in Vorwärtsrichtung gestreuten Lichtes ist ein Maß für die Zellgröße und wird vom sog. FSC-Detektor (*Forward Scatter*) gemessen. Das Seitwärtsstreulicht wird dagegen vom SSC-Detektor (*Side Scatter*) aufgenommen und läßt Rückschlüsse auf die Zelldichte und Granularität der Zellen zu. Graphisch in Dot Plots veranschaulicht ergeben sich anhand dieser morphologischen Kriterien für bestimmte Zellpopulationen bestimmte Bereiche (vgl. Abb. 4.2.4-1). Je größer eine Zelle ist, umso weiter rechts wird sie auf der FSC-Achse aufgetragen. Und je stärker granuliert sie ist, umso weiter oben wird sie auf der SSC-Achse aufgetragen. Wie ebenfalls in Abb. 4.2.5-1 erkennbar ist, können für die selektive Auswertung einzelner Zelltypen sog. *Gates* eingegeben werden, so daß z.B. ausschließlich die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bestimmt werden kann.

### Analyse der Zellen im *Forward-/ Side- scatter*

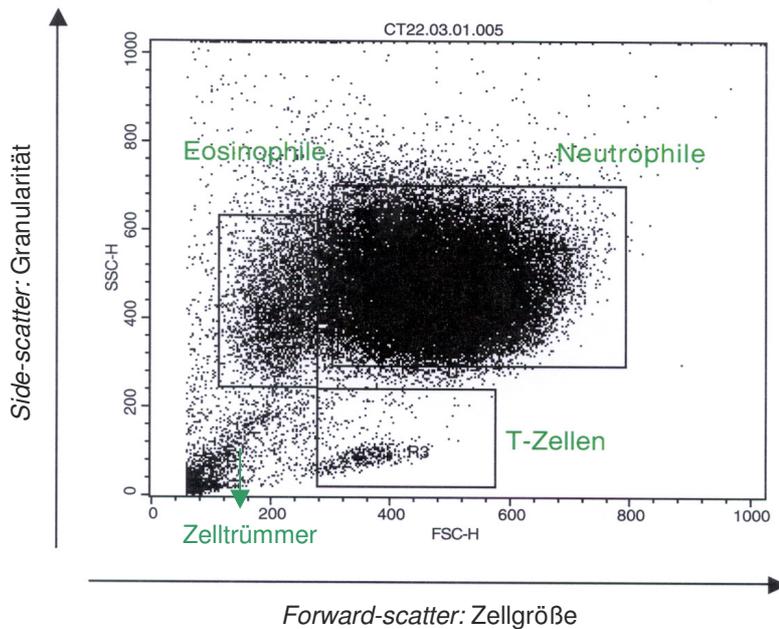


Abb. 4.2.5-1: Graphische Darstellung der FACS-Analyse einer Zellsuspension mittels *Forward-* und *Side-Scatter* im *Dot Plot*. Verschiedene Zellpopulationen sind durch sog. „*Gates*“ eingerahmt.

Neben diesen physikalischen Parametern können durchflußzytometrisch synchron drei Fluoreszenzbereiche gemessen werden. Unter Fluoreszenz versteht man die Emission von Licht durch eine Substanz, die durch kürzerwelliges Licht angeregt wurde (Anregungslicht). Für die Fluoreszenzmarkierung werden die Zellen mit Antikörpern beladen, die einerseits spezifisch für Oberflächenmarker (z.B. CD-Moleküle) und andererseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen sind.

Das Argon-Laserlicht führt zu einer Excitation der Fluoreszenzfarbstoffe, so daß jede Zelle eine Photonenkonzentration emittiert, die sich proportional zur

stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge verhält. Die Lichtsignale werden von einem Photodetektor registriert und dann in ein elektronisches Signal (Spannungspuls) umgewandelt. Mit einer geeigneten Software (CellQuest) können die so gewonnenen Daten im Computer ausgewertet und graphisch dargestellt werden. Eine gleichzeitige Messung mit bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen (vgl. Tab. 4.2.5-1).

<b>Fluorochrom</b>	<b>Absorptionsmaxima [nm]</b>	<b>Emmissionsmaxima [nm]</b>
Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)	495	519
Peridin Chlorophyll (PerCP)	490	675
Phycoerythrin (PE)	480; 565	578
Propidiumjodid (PJ)	550	650

Tab. 4.2.5-1: Häufig gebräuchliche Fluorochrome für Durchflußzytometer mit Argonlaser

#### **4.2.5.1 Durchflußzytometrische Quantifizierung migrierter neutrophiler Granulozyten**

Im Anschluß an die Durchführung des im Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Transwell-Migrationsassays wurde die Quantifizierung der transmigrierten PMN bei einer Analysedauer von 60 Sekunden pro Röhrchen und einer definierten Durchflußrate von 60 µl/min. durchgeführt. Durch Eingabe geeigneter *Gates* (siehe Abb. 4.2.5-1) wurde selektiv die Anzahl der migrierten neutrophilen Granulozyten quantifiziert. Die Veranschaulichung erfolgt in *Dot Plots*, in welchen jede Zelle als

Punkt in einem Koordinatennetz dargestellt wird.

#### **4.2.5.2 Durchflußzytometrische Darstellung der Oberflächenexpression von CD11b**

Als weiterer Marker für die Aktivierung, insbesondere für die transmigratorische Kapazität von neutrophilen Granulozyten gilt das  $\beta_2$ -Integrin CD11b. Daher wurde die Expression von CD11b nach einstündiger Inkubation mit verschiedenen Pollenextrakten, sowie mit LTB<sub>4</sub> als Positivkontrolle, durchflußzytometrisch untersucht.

Hierfür wurden die PMN unmittelbar nach der Isolation (siehe 4.2.4) mit wässrigen Extrakten der Konzentration [34mg Pollen/ml] von Birken- und Gräserpollen (*Betula alba L.* bzw. *Phleum pratense L.*, Allergon, Ängelholm, Schweden) sowie mit LTB<sub>4</sub> der Konzentration  $3,9 \times 10^{-10} \text{M}$  als Positivkontrolle, in 24-well-Platten von Costar stimuliert. In jedem *Well* wurde 1ml der Zellsuspension [ $2 \times 10^6$  PMN/ml] mit 1ml der jeweiligen Aktivatorssubstanz versetzt. Nach eineinhalbstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Inhalt der *Wells* in Eppendorf-Röhrchen überführt, die dann 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert wurden. Die Pellets wurden zweimal mit jeweils 200µl FACS-Puffer resuspendiert und dann auf je zwei *Wells* einer 96-Well-Rundbodenplatte (Corning Costar) aufgeteilt, um jede Probe mit dem monoklonalen CD11b-Antikörper, sowie dem entsprechenden IgG-Isotyp-Antikörper anfärben zu können. Die Isotypenkontrolle (Antikörper der Immunglobulinklasse IgG<sub>1</sub> von derselben Spezies wie der spezifische Antikörper aber ohne spezifische Bindungsstellen für CD11b) dient als Negativkontrolle zur Bewertung der Fluoreszenz, die aus einer unspezifischen Bindung resultiert.

Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte die Färbung der Zellen nach dem Prinzip der indirekten Fluoreszenzmarkierung. Dazu wurden die Zellen in einem ersten Färbeschritt mit jeweils 10µl des monoklonalen CD11b-Antikörpers in der Verdünnung 1:10 (Klon ICRF44) bzw. 10µl des entsprechenden IgG-Isotyp-Antikörpers in der Verdünnung 1:50 beladen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis unter Lichtabschluß erfolgte die Zugabe von 10µl des FITC-

konjugierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörpers (Verdünnung 1:10) in alle *Wells* zur „Sichtbarmachung“ der nicht fluoreszierenden Erstantikörper im Durchflußzytometer (Primär- und Sekundärantikörper jeweils von Becton Dickinson, San Jose, USA).

Anschließend inkubierten die Zellen nochmals für 20 Minuten auf Eis unter Lichtausschluß, um dann nach zweimaligem Waschen zur Entfernung überschüssiger Fluorochrome in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und in Zytometer-Röhrchen überführt zu werden. Im Durchflußzytometer erfolgte dann die Messung und graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität der unterschiedlich vorbehandelten PMN in Form von Histogrammen von Zellzahl und logarithmischer Fluoreszenzintensität.

#### **4.2.5.3 Durchflußzytometrische Messung des transienten Kalziumflusses**

Dem intrazellulären Kalzium kommt bei vielfältigen zellulären Prozessen eine bedeutende Rolle zu, weswegen seine intrazelluläre Konzentration auch strikt reguliert wird. In der ruhenden Zelle beträgt sie ca. 10-100 nM, in der aktivierten Zelle bis zu 1000 nM [*Carafoli, E. 1987*]. Bindet beispielsweise ein Chemokin an seinen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche, kommt es über die Bildung von Inositol 1,4,5-triphosphat zur Ausschüttung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Danach kann der Kalziumspiegel mit Hilfe der ATPase und der Natrium-Kalziumpumpen wieder normalisiert werden [*Bootman, M.D. und Berridge, M.J. 1995*].

Um die in den neutrophilen Granulozyten bei Kontakt mit Mediatorsubstanzen aus Pollen ablaufenden Signaltransduktionswege näher zu untersuchen, wurden durchflußzytometrische Messungen des transienten intrazellulären Kalziumflusses durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, isoliert. Lediglich dem RPMI-Standardmedium zum Ansetzen der Zellsuspension wurde, anstelle von 0,5% BSA in den Migrationsversuchen, 1% FCS (Fetales Kälberserum) zugesetzt.

Für die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, deren Fluoreszenzintensität sich abhängig von der

Kalziumionen- Konzentration verschiebt. Daher wurden die PMN für eine Stunde im 37°C warmen Wasserbad mit dem Membran-permeablen, Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM (Molecular Probes, Eugene, USA) vorbehandelt.

Dafür wurden zunächst die Fluo-3AM – Aliquots (50µg) in 43,8µl wasserfreiem DMSO gelöst, woraufhin 40 µl dieses Fluoreszenzfarbstoffs der Zellsuspension (10ml,  $2 \times 10^6$  PMN / ml) zugegeben wird. Es folgte die 45-minütige Inkubation der PMN unter Lichtausschluß mit dem Fluoreszenzfarbstoff bei 37°C im Wasserbad. Nach der Inkubation und zwei Waschschritten mit vorgewärmtem Medium, wurde das Pellet wieder mit RPMI-Standardmedium + 1% FCS resuspendiert auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, so daß auch die Zelldichte von  $2 \times 10^6$  PMN / ml wiederhergestellt wurde.

Die so vorbehandelten Zellsuspensionen wurden für die Durchflußzytometrie zu je 1ml auf Zytometer-Röhrchen verteilt. Bis unmittelbar vor der Analyse verblieben die Röhrchen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Anschließend wurde die Fluoreszenz durchflußzytometrisch bestimmt. Hierfür wurde für etwa 10 Sekunden die Fluoreszenzintensität von ruhenden Zellen gemessen. Dann wurden die Zellen durch Zugabe der verschiedenen Aktivatorssubstanzen stimuliert. Durch die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität war es möglich war, den Einfluß des jeweiligen Stimulus auf den intrazellulären Kalziumfluß, gleichsam in Echtzeit zu beobachten.

#### **4.2.5.4 Durchflußzytometrische Untersuchung der Apoptose bzw. Nekrose**

Um zu überprüfen, ob die durch Vorinkubation der PMN mit dem Antihistaminikum Desloratadin bewirkten Effekte durch Induktion von Apoptose bzw. Nekrose bedingt sein könnten, wurden Annexin V- / Propidiumjodidfärbungen durchgeführt.

Da, neben verschiedenen anderen Zelltypen, auch Leukozyten im Rahmen des programmierten Zelltodes physiologischerweise bereits in frühen Apoptose-Stadien Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite auf die Außenseite der Membran translozieren [Vermes, I. et al. 2000], was der Abräumung durch Makrophagen

dient [Fadok, V. et al. 1992], ist das Phospholipid-bindende Protein Annexin V mit seiner hohen Affinität für PS als Marker für apoptotische Zellen besonders geeignet.

Zur Abgrenzung nekrotischer Zellen, die durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden, empfiehlt sich eine Gegenfärbung der Zellen mit einem DNA-Farbstoff wie Propidiumjodid (PJ), der nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen passieren kann. Somit erlaubt die simultane Anwendung von Annexin-V und PJ die Diskriminierung zwischen Zellen in frühen und späten Apoptosestadien sowie nekrotischen Zellen.

Für die Durchführung dieser Färbung werden die Zellen, wie beschrieben, isoliert und gewaschen. Im Anschluß daran erfolgt ein Waschschrift mit einem „*binding buffer*“ des Herstellers (Bender MedSystems, Wien, Österreich). Nach Quick-Spin-Zentrifugation der Zellen bei 836 x g wird das Zellpellet in 100µl des verdünnten Puffers resuspendiert und 2,5 µl Annexin V-FITC (BMS306FI) werden hinzugefügt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß, werden die Zellen erneut durch Zentrifugation bei 836 x g gewaschen, woraufhin wird das Pellet in 170 µl verdünntem Puffer aufgenommen und es werden 10 µl PJ hinzugefügt. Nun werden die Zellen zur anschließenden Analyse in Zytometer-Röhrchen überführt.

#### **4.2.6 MPO-Radioimmunoassay**

Als weiterer Parameter zur Untersuchung der Aktivierung neutrophiler Granulozyten, wurde die Freisetzung der Myeloperoxidase (MPO) aus den azurophilen Granula der Neutrophilen als Marker für die Degranulation dieser herangezogen. Nach eineinhalbstündiger Inkubation der Neutrophilen mit verschiedenen Pollenextrakten wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> (siehe 4.2.3) in Eppendorf-Röhrchen überführt, die dann 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugiert wurden. Anschließend wurde die MPO-Konzentration in den

zellfreien Überständen mittels Radioimmunoassay (RIA, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt.

Bei diesem MPO-RIA handelt es sich um einen kompetitiven Assay, wobei eine definierte Menge mit Jod<sup>125</sup> markierten Antigens mit dem Antigen der Probe um die Bindungsstellen spezifischer Antikörper konkurriert. Überschüssiges, nicht gebundenes MPO wird durch Zugabe eines weiteren Antikörpers, gefolgt von einem Waschschrift mit Zentrifugation und Verwerfen des Überstands entfernt. Im Anschluß daran wird die Radioaktivität des verbliebenen Pellets aus Antigen-Antikörper-Komplexen in einem Gammazähler (Berthold, München) gemessen, wobei sich die gemessene Radioaktivität umgekehrt proportional zur MPO-Menge in der Probe verhält.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Einfluß von Pollenextrakten auf Effektorfunktionen von Neutrophilen**

Nachdem Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ergeben hatten, daß aus Pollen Substanzen freigesetzt werden, die im ELISA mit LTB<sub>4</sub>-Antikörpern kreuzreagieren und die bei neutrophilen Granulozyten morphologische Veränderungen bewirken können [Behrendt, H. et al. 2001], sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob diese Substanzen auch LTB<sub>4</sub>-ähnliche Wirkungen aufweisen. Funktionelle Effekte dieser Substanzen auf Neutrophile werden im folgenden Ergebnisteil hinsichtlich Migrationsverhalten, Integrinexpression und Degranulation aufgezeigt.

### 5.1.1 Einfluß von Pollenextrakten auf die Chemotaxis von PMN

Als primärer Parameter für funktionelle Wirkungen von Pollenextrakten auf neutrophile Granulozyten, wurde deren chemotaktische Wirksamkeit untersucht. Um den Einfluß auf die gerichtete Migration zu analysieren, wurde der in Abb. 4.2.6-1 aufgezeigte Versuchsansatz verwendet.

Unter 5.1.1.1 werden zunächst Migrationsexperimente mit neutrophilen Granulozyten von Atopikern auf wässrige Extrakte verschiedener Pollenspezies aufgezeigt. Im Abschnitt 5.1.1.2 wird dann der Vergleich der chemotaktischen Aktivität der PMN von Atopikern und Nicht-Atopikern auf Gräser- und Birkenpollen dokumentiert. Für die Beurteilung des Ausmaßes der Migration, wird jeweils der sogenannte Migrationsindex (MI) verwendet, in den die zufällige, ungerichtete Migration einbezogen wird, zu der es auch ohne Vorhandensein eines Chemoattraktanz kommt. Von signifikanter Chemotaxis wird dabei ab einem MI von mindestens 2 gesprochen.

$$\text{Migrationsindex (MI)} = \frac{\text{Anzahl der gegen Stimulans migrierten Zellen}}{\text{Anzahl der gegen Medium migrierten Zellen}}$$

Die zur Stimulation der PMN verwendeten Pollenextrakt-Konzentrationen wurden so gewählt, daß sie mit Konzentrationen der Positivkontrolle LTB<sub>4</sub> vergleichbar waren. In der Literatur wird beschrieben, daß LTB<sub>4</sub> in Konzentrationen um 3,9x10<sup>-10</sup>M chemotaktisch wirksam ist [*Ford-Hutchinson, A.W. 1990*]. Analog dazu wurden wässrige Pollenextrakte in Konzentrationen von 0,034 – 34mg/ml verwendet, da in Vorarbeiten mittels LTB<sub>4</sub>-ELISA ermittelt worden war, daß die Menge an LTB<sub>4</sub>-ähnlicher Substanz in wässrigen Birkenpollenextrakten der Konzentration 34mg/ml, 3,9x10<sup>-10</sup>M betrug.

### **5.1.1.1 Chemotaktische Wirkung von wässrigen Extrakten verschiedener Pollenspezies**

In Anlehnung an die bereits weiter oben beschriebenen Vorbefunde, daß verschiedene Pollenspezies unterschiedliche Mengen an Eikosanoid-ähnlicher Substanz freisetzen [Behrendt, H. et al. 2001] wurde mit dem nachfolgend aufgezeigten Versuchsansatz zum einen untersucht, ob wässrige Pollenextrakte (wPE, vgl. Abschnitt 4.2.1.1), verglichen mit LTB<sub>4</sub>, chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten ausüben. Zum anderen wurde überprüft, ob es signifikante Unterschiede hinsichtlich der chemotaktischen Potenz der identisch hergestellten wässrigen Extrakte von Birken-, Gräser- und Kiefernpollen gibt.

Interessanterweise führte die Stimulation von PMN für 90 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank mit Extrakten von Birken- und Gräserpollen in LTB<sub>4</sub>-äquivalenten Dosen zu einer signifikanten, dosisabhängigen, gerichteten Migration. Wie aus Abbildung 5.1.1.1 ersichtlich ist, erreichten wässrige Extrakte von Birken- und Gräserpollen in den höchsten Konzentrationen (34mg/ml) 60% der chemotaktischen Aktivität von LTB<sub>4</sub>. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit wässrigem Extrakt von Kiefernpollen zu keiner signifikanten Chemotaxis.

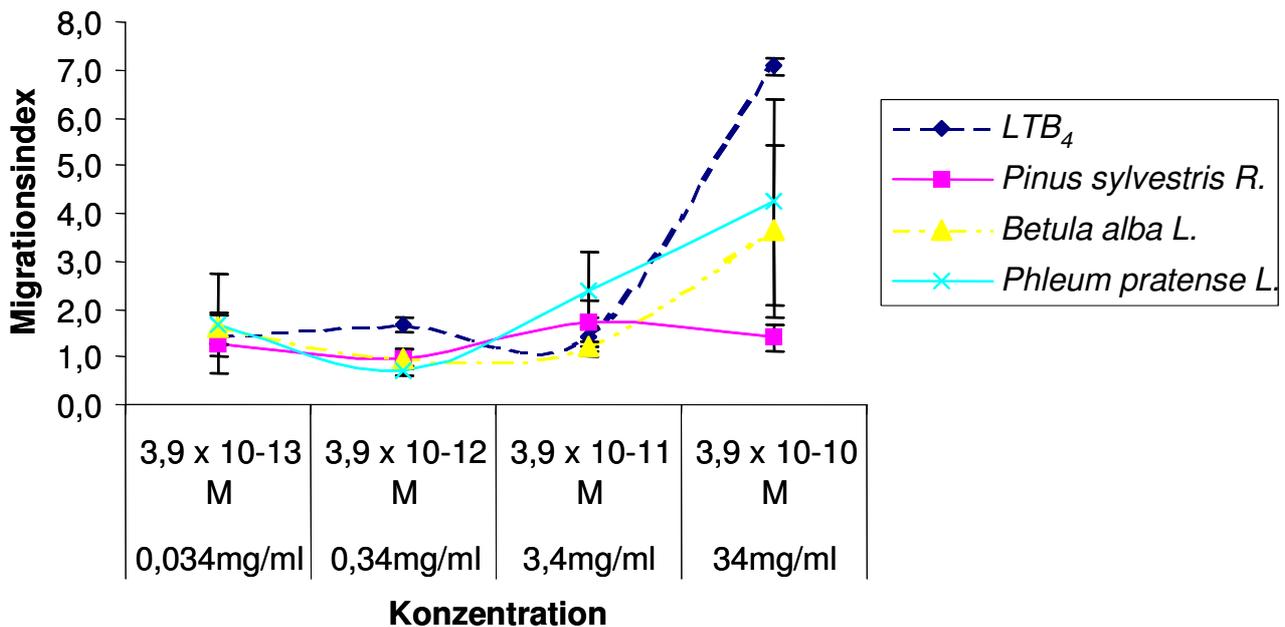


Abb. 5.1.1-1: Chemotaxis (MI) von PMN eines Atopikers gegen wässrige Extrakte verschiedener Pollenspezies im Vergleich mit  $LTB_4$ . Angegeben sind Mittelwerte eines von drei in Doppelansätzen durchgeführten Experimenten. Die Fehlerindikatoren beziehen sich auf die Mittelwertabweichung der Doppelansätze.

### 5.1.1.2 Chemotaxisvergleich von PMN von Atopikern und Nicht-Atopikern auf wässrige Pollenextrakte

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob dieser bei Atopikern gezeigte Effekt vom allergischen Status des Probanden abhängig war. Daher wurde untersucht, ob PMN von Atopikern und Nicht-Atopikern hinsichtlich ihrer chemotaktischen Reaktion auf wPE Unterschiede aufwiesen.

Wie aus dem Diagramm hervorgeht, wurden durch Inkubation der PMN mit wässrigen Birken- und Lieschgraspollen-Extrakten, Migrationsindices von bis zu 80%, verglichen mit  $LTB_4$ , erzielt. Hinsichtlich des Migrationsverhaltens der Neutrophilen von Atopikern und Nicht-Atopikern gab es keine signifikanten Unterschiede.

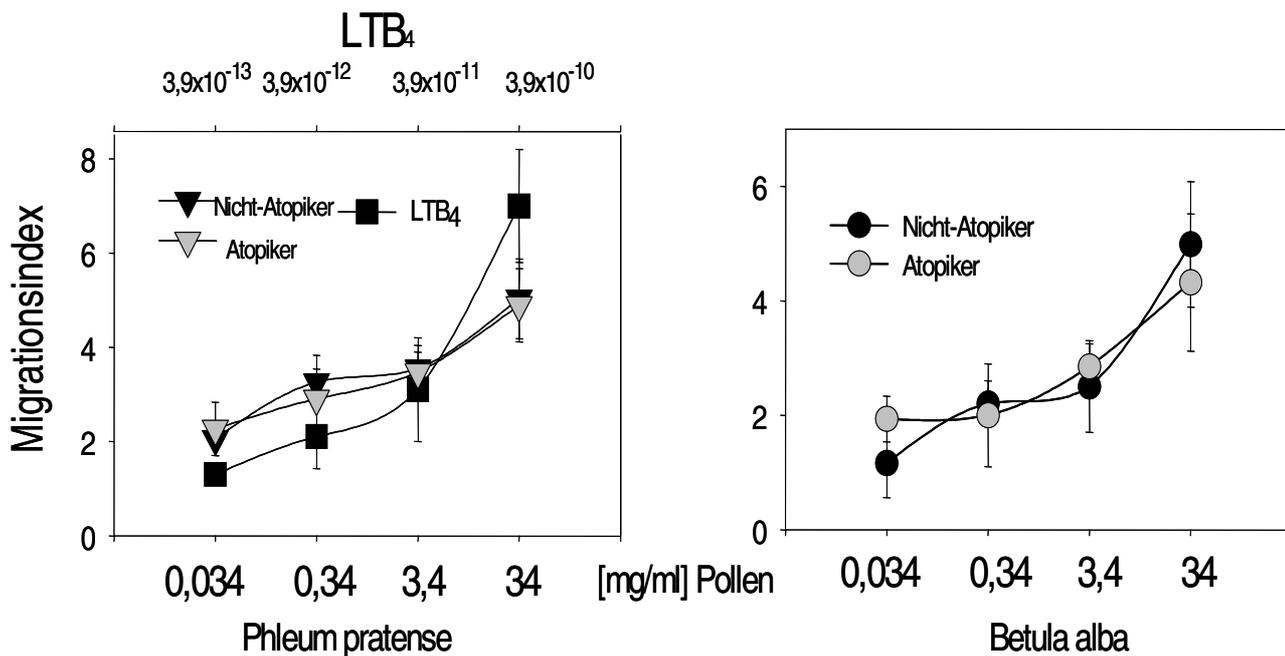


Abb. 5.1.1.2: Graphische Darstellung der dosisabhängigen Chemotaxis der PMN von 9 Birkenpollenallergikern, 3 Gräserpollenallergikern und 11 Nicht-Atopikern gegen wässrige Extrakte von Birken- und Gräserpollen der Konzentrationen [0,034 bis 34mg/ml] sowie gegen LTB<sub>4</sub> der Konzentrationen [ $3,9 \times 10^{-13}$ M bis  $3,9 \times 10^{-10}$ M]. Angegeben sind Mittelwerte mit  $\pm$  Standardabweichung.

### 5.1.1.3 Einfluß des LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten LY293111 auf die chemotaktische Wirkung von wPE

Aufgrund der Annahme, die chemotaktische Potenz der wPE sei durch Freisetzung von LTB<sub>4</sub>-ähnlichen Mediatoren aus den Pollen bedingt, wurde der Einfluß der Vorbehandlung der PMN mit dem selektiven LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten LY293111 [Jackson, W.T. et al. 1999], [Sofia, M.J. et al. 1997] auf die Pollen-induzierte Chemotaxis näher beleuchtet. Wie Abb. 5.1.1.3 veranschaulicht, führte die 30minütige Vorinkubation der PMN mit LY293111 der Konzentrationen 4000 bis 40000nM zu einer signifikanten Hemmung der

Chemotaxis der PMN gegen  $\text{LTB}_4$ . Auch die gerichtete Migration gegen wPE wurde signifikant inhibiert. Dabei kam es zu einer 90%igen Hemmung der Chemotaxis gegen  $\text{LTB}_4$ , während die chemotaktische Antwort gegen die wPE um bis zu 70% reduziert wurde. Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung des  $\text{LTB}_4$ -Rezeptors an der Vermittlung der Neutrophilen-Migration gegen wPE. Zur Überprüfung der Selektivität des  $\text{LTB}_4$ -Rezeptorblockers LY293111 wurden damit vorbehandelte PMN auch mit dem potenten Chemokin Interleukin-8 (IL-8) stimuliert. Es zeigte sich, daß LY293111 keinen Einfluß auf die durch IL-8 induzierte Chemotaxis der PMN hat.

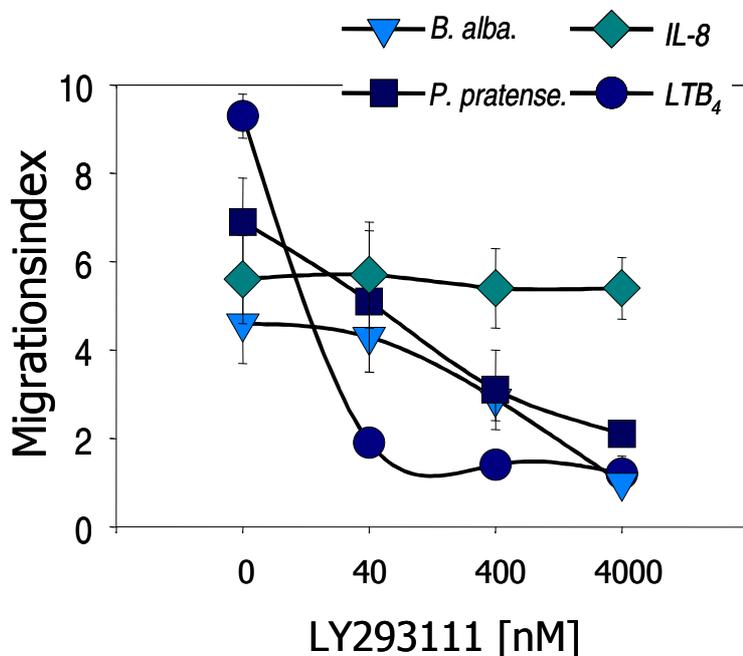


Abb. 5.1.1.3: Einfluß des  $\text{LTB}_4$ -Rezeptorantagonisten LY293111 auf die Chemotaxis von PMN gegen wässriges Extrakt von Lieschgras- (*Phleum pratense*) und Birkenpollen (*Betula alba*) und  $\text{LTB}_4$  zum Vergleich. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für 6 Experimente, die mit PMN von 3 Atopikern und 3 Nicht-Atopikern durchgeführt wurden.

#### 5.1.1.4 Chemotaktische Wirkung von Lipidextrakten von Birken- und Gräserpollen auf PMN

Um die aus den Pollen freigesetzten Substanzen, die für die Chemotaxis von PMN verantwortlich sind, näher zu charakterisieren, wurden Lipidextrakte von Birken- und Lieschgraspollen hergestellt, deren Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mittels HPLC (High Pressure Liquid Chromatographie = Hochleistungs-Flüssigchromatographie) analysiert wurde. Dabei wurde festgestellt, daß sowohl Birken- als auch Lieschgraspollen substantielle Mengen an Derivaten der Linol- und Linolensäure enthalten, wobei v.a. in Birkenpollen anteilmäßig die 13-Hydroxy-oktadekadiensäure (13-HODE) mit 9,1 nmol pro Gramm Pollen den größten Anteil der Linolsäurederivate darstellte. 13-HODE war bereits 1991 von Henricks et al. als chemotaktische Substanz für neutrophile Granulozyten beschrieben worden [Henricks, P. A. et al. 1991].

Daher wurden die bereits mit wPE durchgeführten Chemotaxisversuche auch mit von Prof. Dr. Feußner zur Verfügung gestellten Lipidextrakten durchgeführt, deren Gehalt an 13-HODE und 13-HOTE mittels HPLC quantifiziert worden war (vgl. Abschnitte 4.2.1.2 und 4.2.1.3). Die Herstellung der Extrakte erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde ein Gesamtlipidextrakt in Hexanisopropanol hergestellt. Die so gewonnenen Extrakte wurden nachfolgend als „HIP“-Extrakte bezeichnet. In einem weiteren Schritt wurden diese HIP-Extrakte mittels *Reverse Phase* (RP)-HPLC weiter aufgereinigt, was zu einer Lösung von v.a. monohydroxylierten Produkten der Linol- und Linolensäure führte.

Die Chemotaxisversuche wurden wie bereits beschrieben durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.5). Dabei wurden HIP- und RP-Extrakte von Birken- (*Betula alba*) und Lieschgraspollen (*Phleum pratense*) in Verdünnungen verwendet, die 13-HODE in Konzentrationen von  $1 \times 10^{-15}$  mol/L bis  $1 \times 10^{-9}$  mol/L enthielten. Wie in Abb. 5.1.1.4 A dargestellt, führte die Stimulation mit HIP-Extrakten beider Pollenspezies ab einer 13-HODE-äquivalenten Konzentration von  $1 \times 10^{-15}$  mol/L zu einer signifikanten Migration durch die Membran der Zweikammerplatte, die ab einer Konzentration von  $1 \times 10^{-13}$  mol/L linear mit der 13-HODE-Dosis anstieg. Ähnlich wie bei den wPE, wiesen auch die HIP-Extrakte von Birken- und Lieschgraspollen in

niedrigeren Konzentrationen hinsichtlich ihrer chemotaktischen Potenz keine wesentlichen Unterschiede auf. Ab einer Molarität von  $1 \times 10^{-13}$  mol/L 13-HODE-Äquivalent jedoch, war die chemotaktische Reaktion auf die HIP-Phase von Birkenpollen signifikant höher, als die von Lieschgraspollen. Dieses Ergebnis spricht gegen die Annahme, 13-HODE sei die für die Migration der PMN hauptverantwortliche Substanz, da, wie die Tabellen 4.2.2.2-1 und 4.2.2.2-2 verdeutlichen, die HIP-Phase von Lieschgraspollen eine weit höhere Menge an 13-HODE enthält als die von Birkenpollen.

Die Stimulation der PMN mit der RP-Phase der organischen Extrakte konnte ebenfalls eine chemotaktische Reaktion der Neutrophilen induzieren, wenngleich diese, verglichen mit den HIP-Extrakten, signifikant geringer ausfiel. Außerdem kam es, unabhängig von der Pollenart, erst zu einer signifikanten Migration ab einer RP-Phase-Konzentration, die einer 13-HODE-Dosis von  $1 \times 10^{-11}$  mol/L entsprach. Die höhere chemotaktische Wirksamkeit ist möglicherweise auf summative Effekte mehrerer Substanzen in den HIP-Extrakten zurückzuführen, wobei auch andere Stoffe als die monohydroxylierten Fettsäuren für die migratorische Aktivität der PMN verantwortlich sein könnten.

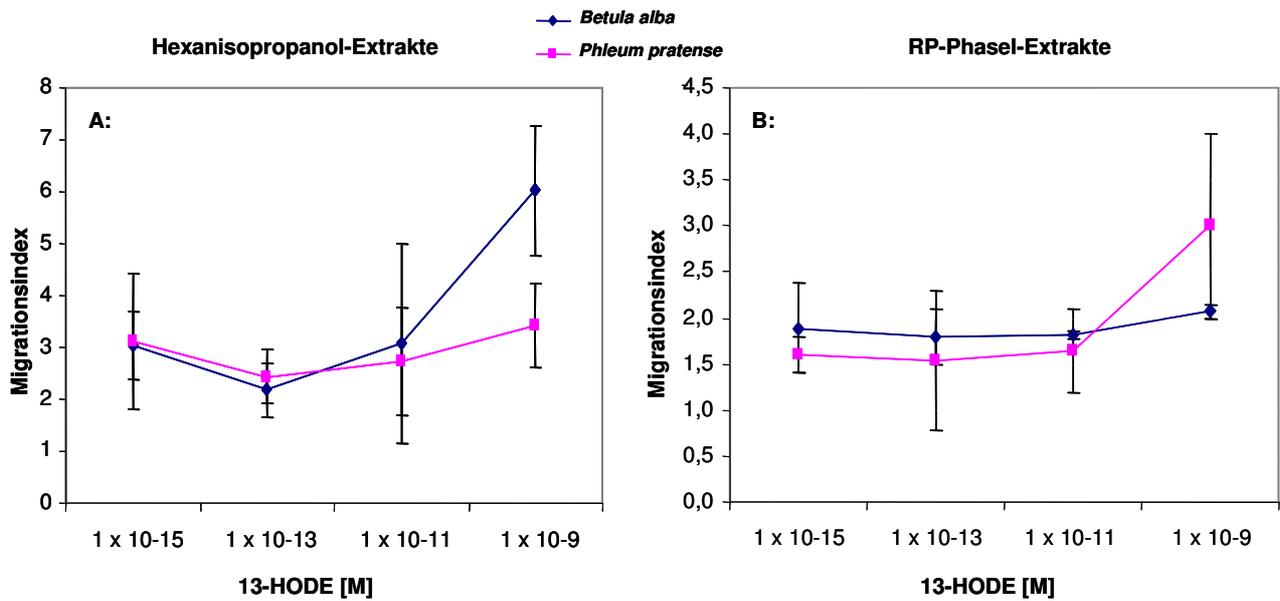


Abb. 5.1.1.4-1: Migrationsindices von PMN, hervorgerufen durch Lipidextrakte von Birken- (*Betula alba*) und Lieschgraspollen (*Phleum pratense*). **A:** Dargestellt sind die gepoolten Daten von drei mit HIP-Extrakten durchgeführten Versuchen.

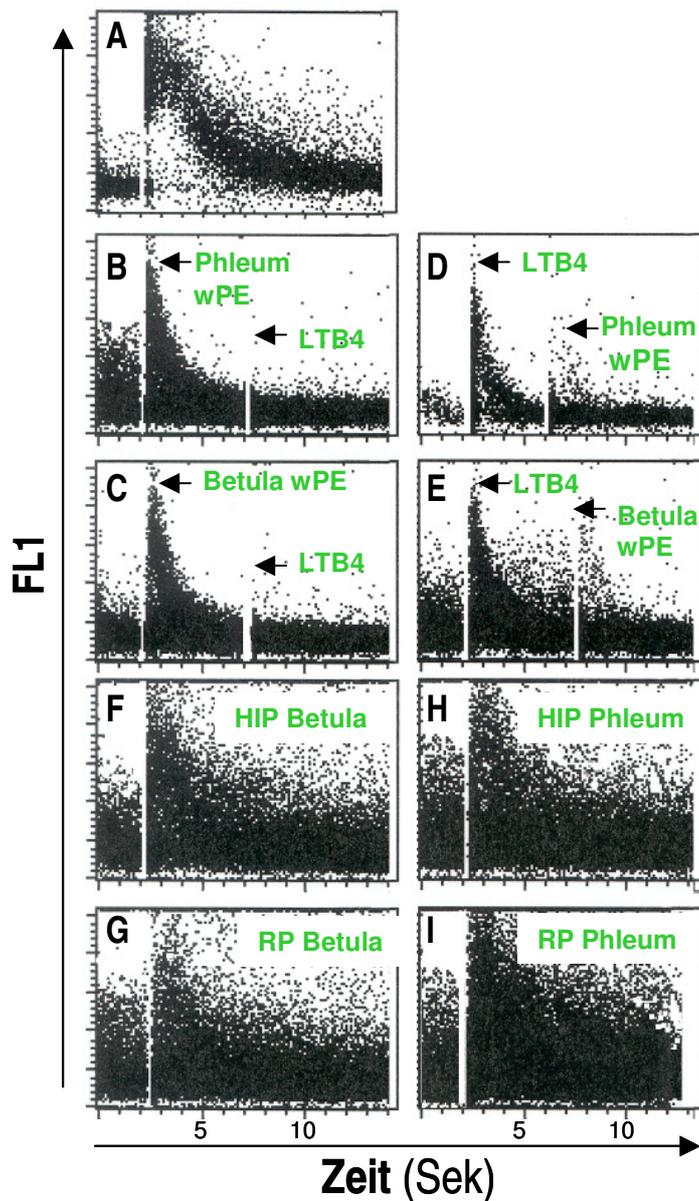
**B:** Migrationsindices von PMN gegen RP-Phase, wobei die Daten eines Experiments stellvertretend für insgesamt 7 durchgeführte Experimente aufgetragen sind. Die Fehlerindikatoren geben jeweils die  $\pm$  Standardabweichung der Mittelwerte an.

### 5.1.2 Untersuchung der Kalziummobilisation in Neutrophilen durch wasserlösliche Pollenbestandteile

Um zu klären, ob die Mediatorsubstanzen aus Pollen ihre Wirkungen über rezeptorvermittelte Signalwege entfalten, wurden durchflußzytometrische Kalziumflußmessungen durchgeführt. Dafür waren die neutrophilen Granulozyten nach ihrer Präparation mit membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3AM (Molecular Probes, Eugene, USA) gefärbt worden (siehe 4.2.4.3). Die so vorbehandelten Zellsuspensionen verblieben bis unmittelbar vor der Analyse im

Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Im Anschluß konnte die Fluoreszenzintensität in Echtzeit gemessen werden, wobei zunächst für einige Sekunden der basale Kalziumfluß der einzelnen Proben aufgezeichnet wurde. Im Verlauf wurde die Kalziummobilisierung quantifiziert, die durch Zugabe der verschiedenen Aktivatorsubstanzen hervorgerufen wurde. Durch wässrige Extrakte von Birken- und Lieschgraspollen wurde ein signifikanter Kalziumfluß induziert (Abb. 5.1.2-1 A-C). Dabei war das Ausmaß der Kalziummobilisierung nach Zugabe von wPE der Konzentration 34mg/ml in etwa mit der Wirkung der LTB<sub>4</sub>-Zugabe 3,9 x 10<sup>-10</sup> M vergleichbar. Auch Lipidextrakte von Birken- und Lieschgraspollen induzierten eine signifikante Kalziumflußerhöhung (Abb. 5.1.2-1 F-K). In Dosen, die einer 13-HODE-Konzentration von 1 x 10<sup>-7</sup> M entsprachen, bewirkten sowohl HIP-Extrakte, als auch die RP-Phase beider Spezies diesen Effekt. Diese Befunde sprechen dafür, daß die bereits gezeigte Chemotaxisinduktion bei PMN durch Pollenmediatoren rezeptorvermittelt abläuft und nicht vom allergischen Status der Probanden abhängig ist.

Aufgrund des bereits gezeigten Befundes, daß der LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonist LY293111 die Chemotaxis gegen Pollenextrakte wirksam reduziert, wurde der Frage nachgegangen, ob die durch Pollen bedingte Kalziummobilisierung über den LTB<sub>4</sub>-Rezeptor vermittelt war. Hierfür wurden Desensibilisierungsversuche durchgeführt, in denen der Kalziumfluß bei PMN untersucht wurde, die zuvor bereits mit wPE stimuliert worden waren. Interessanterweise, reagierten solche Neutrophile bei Zugabe von LTB<sub>4</sub> nicht mehr mit neuerlicher Kalziummobilisierung (vgl. Abb. 5.1.2-1 B und C). Umgekehrt bewirkten die wässrigen Birken- und Lieschgraspollenextrakte bei PMN, denen zuvor bereits LTB<sub>4</sub> zugegeben worden war, nur noch eine geringe Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (vgl. Abb. 5.1.2-1 D und E).



**Abb. 5.1.2-1:** Intrazellulärer Kalziumfluß von PMN, hervorgerufen durch wässrige und Lipidextrakte von Pollen. **A**, LTB<sub>4</sub> [ $3.9 \cdot 10^{-10}$  mol/L]. **B** und **C**, wässrige Extrakte von Lieschgras- bzw. Birkenpollen (jeweils [34 mg / ml]).

**F** bis **I**, Kalziummobilisierung in PMN, hervorgerufen durch Lipidextrakte; **F**, HIP-Extrakte von Birkenpollen [ $1 \times 10^{-10}$ M]; **G**, RP-Phase von Birkenpollen [ $1 \times 10^{-10}$ M]; **H**, HIP-Extrakte von Lieschgraspollen [ $1 \times 10^{-10}$ M]; **I**, RP-Phase von Lieschgraspollen [ $1 \times 10^{-10}$ M]. Für die Desensibilisierungsexperimente, wurden die PMN zuerst mit wässrigen Pollenextrakten stimuliert, gefolgt von LTB<sub>4</sub> (**B** und **C**), bzw. in umgekehrter Reihenfolge (**D** und **E**).

Im nachfolgend dargestellten Experiment wurde untersucht, ob die Vorbehandlung der neutrophilen Granulozyten mit dem LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten LY293111 die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern beeinflusst. Nach Blockierung des LTB<sub>4</sub>-Rezeptors läßt sich durch LTB<sub>4</sub> kein Kalziumfluß über den Basalwert ruhender PMN induzieren (vgl. Abb. 5.1.2-2 B). Die Stimulierung mit wässrigem *Phleum*-Extrakt bewirkt bei LY293111-vorbehandelten PMN - im Gegensatz zu nicht vorbehandelten Zellen (vgl. 5.1.2-2 A) - nur noch eine minimale Kalziumflußinduktion über das basale Maß hinaus. Auch die Ergebnisse dieses Experiments sprechen dafür, daß LTB<sub>4</sub>-Rezeptoragonisten zur Auslösung der gezeigten funktionellen Reaktionen der PMN zumindest beitragen. Wenngleich es sich bei diesem Versuch um ein Einzelexperiment handelt, das auch als solches zu bewerten ist, so geht es doch konform mit den Befunden der weiter oben beschriebenen Desensibilisierungsversuchen.

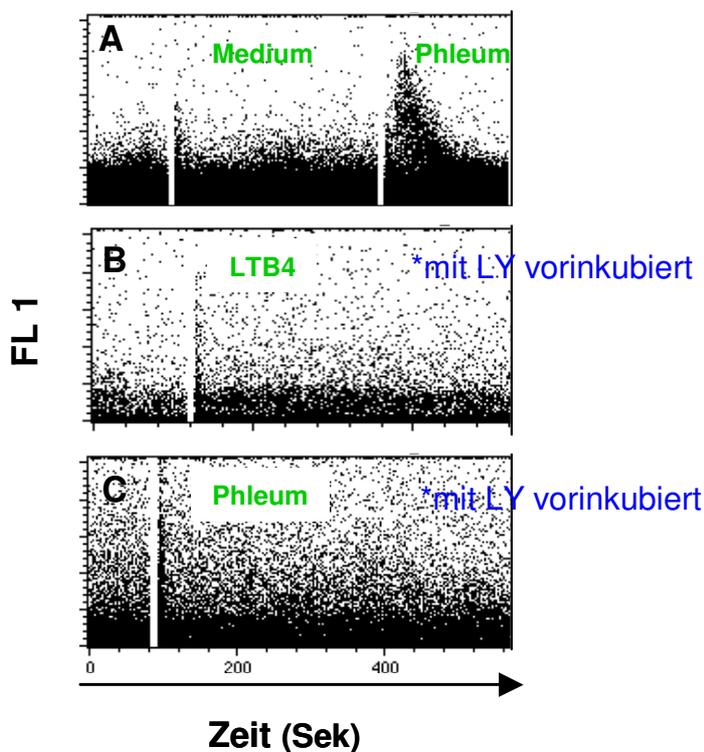


Abb. 5.1.2-2: **A**, Kalziummobilisierung durch Medium bzw. wässrigem Extrakt von Lieschgraspollen bei nicht vorbehandelten PMN. **B**, Kalziumfluß vor und nach LTB<sub>4</sub>-Zugabe bei PMN, die mit dem LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten LY293111 vorinkubiert worden waren. **C**, Kalziumfluß vor und nach Zugabe von wässrigem Lieschgraspollenextrakt bei PMN, die ebenfalls mit LY vorinkubiert worden waren.

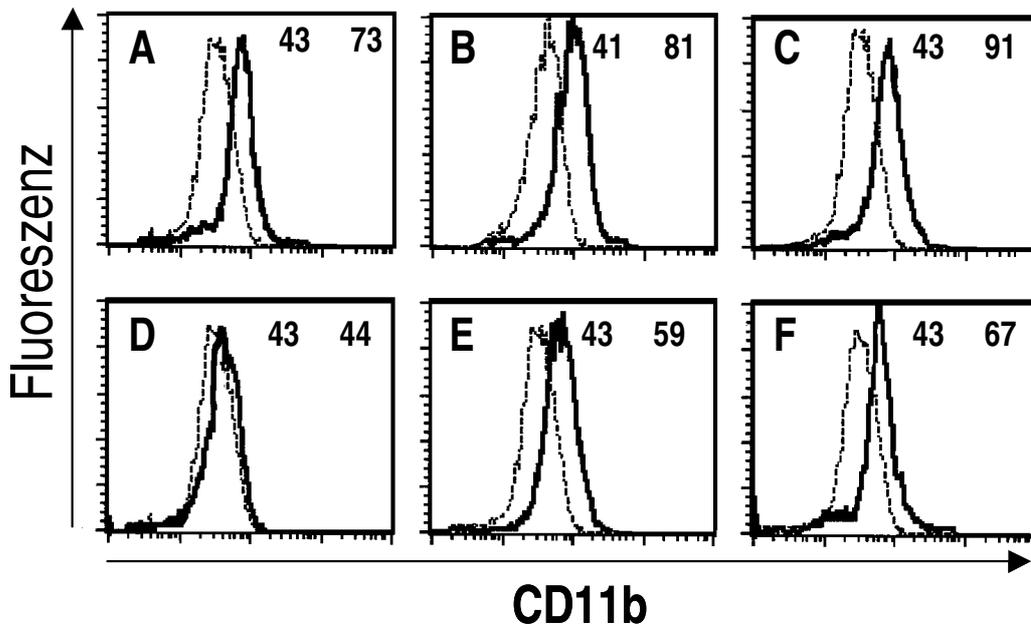
### 5.1.3 Konstitutive und induzierte CD11b Expression

Als ein weiterer etablierter Marker für die Aktivierung neutrophiler Granulozyten, wurde die CD11b-Expression von Neutrophilen herangezogen. Dabei wurde durchflußzytometrisch die Hochregulierung des  $\beta_2$ -Integrins nach Stimulation der Zellen mit Pollenextrakten im Vergleich zu LTB<sub>4</sub> analysiert. Nach Isolation und Aufnahme der Neutrophilen in RPMI-Standardmedium plus 10% FCS, wurden die Aktivatorsubstanzen der verschiedenen angegebenen Konzentrationen zugegeben. Im Durchflußzytometer wurde die CD11b-Expression 5 bis 60 Minuten, sowie 2 bzw. 12 Stunden nach der Stimulation quantifiziert.

In den durchgeführten Versuchen führten die wPE der Konzentration 34mg/ml zu einer ähnlichen CD11b-Expression wie LTB<sub>4</sub>  $3.9 \cdot 10^{-10}$  mol/L. Dabei wiesen wässrige Extrakte von Birkenpollen, gegenüber denen von Lieschgraspollen, eine leicht, jedoch nicht signifikant höhere Potenz hinsichtlich der CD11b-Induktion auf (Abb. 5.1.3, B and C). Bemerkenswert hierbei ist, daß sogar 24 Stunden nach der Stimulation mit wPE noch ein hohes Maß an CD11b-Expression vorlag, obwohl normalerweise die CD11b-Expression nur ein vorübergehender Zustand ist, wie von Davey et al. beschrieben [Davey, P.C. et al. 2000].

Auch die Lipidextrakte beider Pollenarten führten zu einer Zunahme der CD11b-Expression, was auf die besondere Bedeutung der Lipidmediatoren für die gezeigten Effekte hindeutet. Wie in Abb. 5.1.3, E und F exemplarisch mit Lieschgraspollenextrakten gezeigt wird, führten sowohl die HIP-Extrakte, als auch die RP-Phase von jeweils beiden Pollenspezies zu einer signifikanten Hochregulierung von CD11b. Dagegen hatte die Stimulation mit dem Majorallergen von

Lieschgraspollen rPhl p 5 in Konzentrationen, wie sie auch in wPE zu finden sind [Behrendt, H. 2001], keinerlei Einfluß auf die CD11b-Expression (vgl. Abb. 5.1.3 D).



**Abb. 5.1.3 A-F:** CD11b-Expression von PMN, jeweils nach einstündiger Stimulation mit wässrigen und Lipidextrakten von Pollen, dem Gräserpollen-Majorallergen rPhl p5, sowie durch LTB<sub>4</sub> zum Vergleich.

**A:** Stimulation mit LTB<sub>4</sub> [3,9 · 10<sup>-10</sup> mol/L]. **B:** Stimulation mit wässrigen Gräserpollenextrakten [34mg/ml]. **C:** Stimulation mit wässrigen Birkenpollenextrakten [34mg/ml]. **D:** Stimulation mit 50 g /ml rPhl p5.

**E:** Stimulation mit HIP-Extrakt von Birkenpollen. **F:** Stimulation mit RP-Phase-Extrakt von Birkenpollen.

Die Zahlen repräsentieren die mittlere Fluoreszenz-Intensität nach Abzug der Intensität der Isotypenkontrolle, wobei jeweils der linke Wert für die nicht stimulierte Kontrolle steht (unterbrochene Linie) und der rechte Wert die Fluoreszenz der stimulierten Proben (durchgezogene Linie) entspricht.

Dieses Experiment ist repräsentativ für 6 ähnlich durchgeführte Experimente mit PMN von je zwei Probanden mit Gräser- bzw. Birkenpollenallergie und zwei Nichtallergikern.

#### 5.1.4 MPO-Freisetzung aus Neutrophilen

Als weiterer Parameter zur Beurteilung des Aktivierungszustandes neutrophiler Granulozyten, wurde untersucht, ob die Stimulation der Zellen mit Pollenextrakten zur Degranulation der PMN führen kann. Als Markermolekül hierfür wurde das zytotoxische Enzym Myeloperoxidase (MPO) verwendet, welches bei Aktivierung durch verschiedene Zytokine und Chemoattraktanzien aus den primären Granula von Neutrophilen freigesetzt wird. Die MPO-Konzentrationen wurden dabei mittels Radioimmunoassay (RIA, Pharmacia, Uppsala, Schweden) in zellfreien Überständen von PMN bestimmt, die mit verschiedenen Pollenextrakten vorinkubiert worden waren.

##### 5.1.4.1 MPO-Freisetzung aus Neutrophilen nach Stimulation mit wPE verschiedener Pollenarten

Nach eineinhalbstündiger Inkubation mit wPE der Konzentrationen 0,34mg/ml bis 34mg/ml, wurde aus den zellfrei zentrifugierten Überständen die MPO-Konzentrationen gemessen. In Abb. 5.1.4.1 sind die gepoolten Daten von zwei in Doppelansätzen durchgeführten Versuchen dargestellt, bei denen die Zellen mit wPE von Birken- (*Betula alba*), Lieschgras- (*Phleum pratense*) und Kiefernpollen (*Pinus sylvestris*) stimuliert worden waren. Wie der Graph veranschaulicht, führten die wPE von Birken- und Lieschgras zu einer linearen, dosisabhängigen MPO-Freisetzung aus den PMN. Dagegen führte die Vorinkubation der Neutrophilen mit wPE von Kiefernpollen zu keiner signifikanten MPO-Freisetzung. Diese Ergebnisse sind gut mit dem bereits beschriebenen Befund vereinbar, daß aus Kiefernpollen, verglichen mit Birken- und Lieschgraspollen, weniger Eikosanoid-ähnliche Substanzen freigesetzt werden [Behrendt, H. 2001].

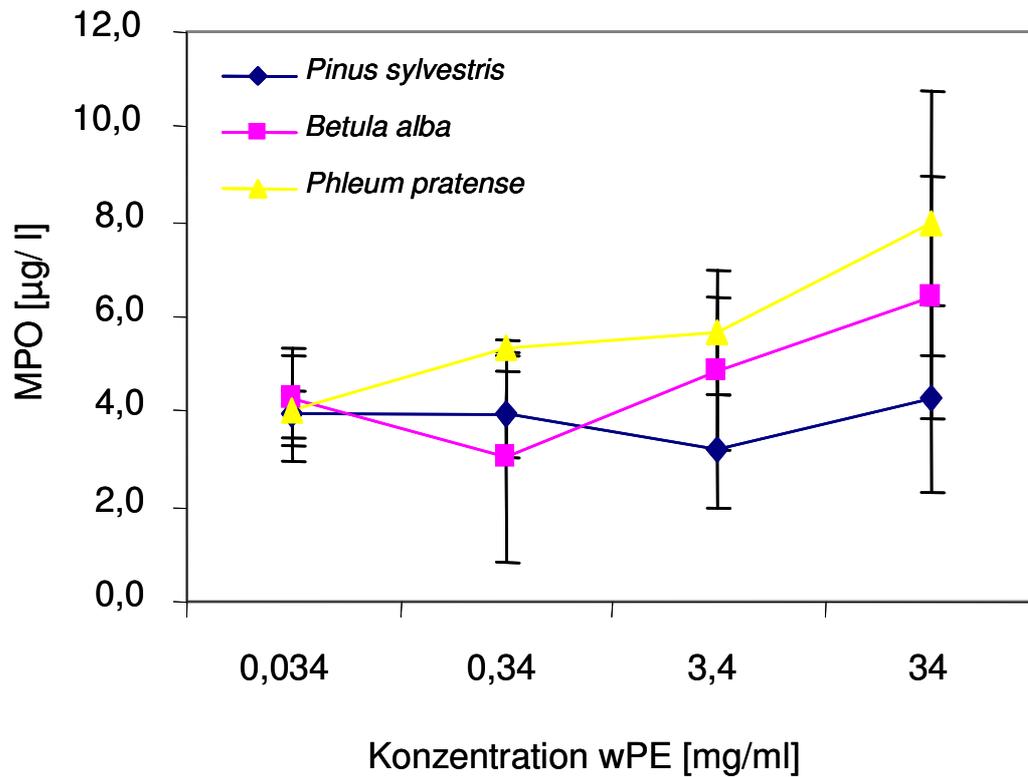


Abb. 5.1.4-1: MPO-Freisetzung [ $\mu\text{g/l}$ ] aus neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit zur Konzentration der zur Stimulierung gebrauchten wässrigen Pollenextrakte (wPE). Dargestellt sind gepoolte MPO-Werte von zwei jeweils im Doppelansatz durchgeführten Experimente. Die Fehlerindikatoren geben jeweils die  $\pm$  Standardabweichung der Mittelwerte an.

#### 5.1.4.2 MPO-Freisetzung aus Neutrophilen nach Stimulation mit Lipidextrakten von Birken- und Lieschgraspollen

Analog wurde auch die degranulationsfördernde Wirkung der Lipidextrakte untersucht. In Abb. 5.1.4.2 sind die Daten eines für 3 Versuche repräsentativen Experiments veranschaulicht. Man sieht, daß sowohl die Hexanisopropanol-Extrakte (HIP-Extrakte), als auch die RP-Extrakte von Birken- und

Lieschgraspollen zur Degranulation von primären Granula der PMN führen. Dabei genügen bei Stimulation mit HIP-Extrakten, verglichen mit den RP-Extrakten, niedrigere 13-HODE äquivalente Dosen, um die gleiche Menge an MPO freizusetzen. Allerdings war die degranulationsfördernde Wirkung der HIP-Extrakte nicht streng dosisabhängig. Stattdessen zeigten sich hinsichtlich der maximalen MPO-Freisetzung zwei *Peaks*, die zum einen bei einer 13-HODE- äquivalenten Dosis von  $1 \times 10^{-13}$  M sowie  $1 \times 10^{-9}$  M zum anderen erreicht wurden. Dies deutet daraufhin, daß verschiedene Substanzen mit unterschiedlicher Wirkungskinetik zu der MPO-Freisetzung aus den PMN beigetragen haben könnten.

Die durch die reineren RP-Phase-Extrakte erzeugte MPO-Freisetzung dagegen stieg proportional mit der 13-HODE-Konzentration an. Dabei wurde mit der RP-Phase von Birkenpollen der 13-HODE äquivalenten Konzentration von  $1 \times 10^{-9}$  M die höchste MPO-Freisetzung hervorgerufen.

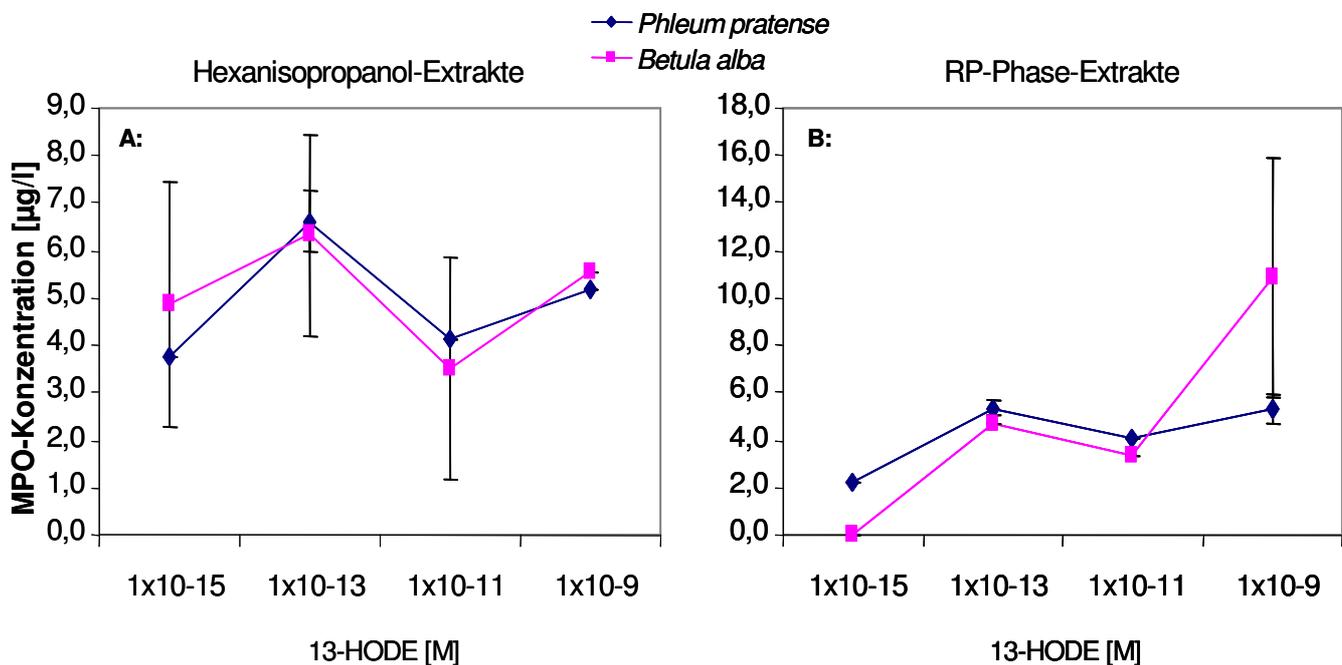


Abb. 5.1.4.2: MPO-Freisetzung aus Neutrophilen durch Lipidextrakte von Pollen. **A**, Stimulation mit HIP-Extrakten von Birken- und Lieschgraspollen. **B**, Stimulation mit RP-Phase beider Pollenarten. Dargestellt sind die Daten eines für 3 Versuche repräsentativen Experiments.

## 5.2 Wirkung von Desloratadin auf Effektorfunktionen von Neutrophilen

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Antihistaminikum der 3. Generation Desloratadin antiinflammatorische Wirkungen entfaltet. Daher wurde *in vitro* untersucht, ob die gezeigten polleninduzierten Effektorfunktionen durch Vorbehandlung der PMN mit Desloratadin verschiedener Konzentrationen beeinflussbar sei.

### 5.2.1 Hemmung der Chemotaxis und Chemokinese

Die Vorinkubation der PMN mit Desloratadin (vgl. 4.2.1.4) führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der Migration sowohl auf Leukotrien B<sub>4</sub> als auch auf wässrige Extrakte von *Phleum pratense*- Pollen. Neben der gerichteten Migration (Chemotaxis) wurde auch die ungerichtete Migration (Chemokinese) inhibiert (Abbildung 5.2.1 A, B). Die Chemotaxis wurde bei einer Konzentrationen von 10µM Desloratadin signifikant inhibiert (bis zu 60%). Die Chemokinese, die auch ein Gradmesser für die allgemeine Aktivierung der PMN ist - wurde schon bei einer Konzentration von 0,1µM um bis zu 60% gehemmt. Bei der in Abb. 5.2.1-1B erkennbaren Erhöhung der Chemokinese bei einer Vorinkubationsdosis von 100µM handelt es sich am ehesten ein Versuchsartefakt.

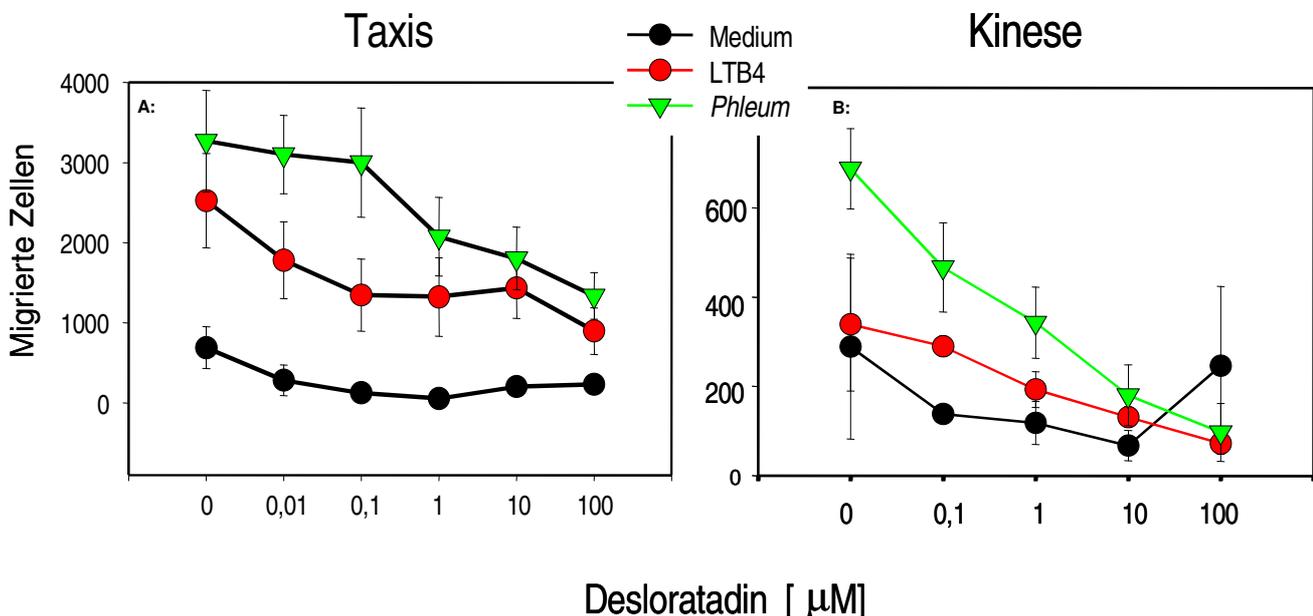


Abb. 5.2.1-1 A und B: Absolute Anzahl der migrierten PMN in Abhängigkeit von der Vorinkubation mit Desloratadin der Konzentrationen [0–100µM]. Zur Stimulation der Zellen wurde LTB<sub>4</sub> [3,9x10<sup>-10</sup> M] bzw. wässriges Extrakt von [34 mg/ml] Phleum pratense verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives, im Doppelansatz durchgeführtes Experiment von fünf durchgeführten.

## 5.2.2 Einfluß von Desloratadin auf die Expression von CD11b

Als nächstes wurde der Einfluß von Desloratadin auf die Expression des  $\beta_2$ -Integrins CD11b untersucht, das bei der Migration und Transmigration von PMN eine bedeutende Rolle spielt. Neutrophile wurden wie oben beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen von Desloratadin vorinkubiert und mit LTB<sub>4</sub> und unterschiedlichen Pollenextrakten stimuliert. Die Expression von CD11b wurde nach einer Stunde im Durchflußzytometer analysiert.

Hierbei zeigte sich, daß sowohl die konstitutive Expression (Medium) als auch die durch Stimulation mit LTB<sub>4</sub> bzw. wPE von Birken- und Lieschgraspollen

induzierte Expression von CD11b durch Desloratadinkonzentrationen von 10 - 1000 $\mu$ M reduziert wurde. Eine signifikante Verminderung der Integrinexpression war allerdings erst ab der Desloratadinkonzentration von 1000 $\mu$ M zu verzeichnen. Die großen interindividuellen Schwankungen der konstitutiven und induzierten CD11b-Expression bedingen die ebenso starken Unterschiede der Fluoreszenzintensität. Trotz der dadurch bedingten erheblichen Standardabweichungen zwischen den Daten von drei durchgeführten Experimenten, sprechen diese Ergebnisse für eine Hemmung der CD11b-Expression von Neutrophilen durch Desloratadin, was - neben den Ergebnissen hinsichtlich des Desloratadineffektes auf die ungerichtete Migration - ein weiteres Indiz dafür wäre, daß Desloratadin den Aktivierungszustand der Neutrophilen negativ beeinflusst.

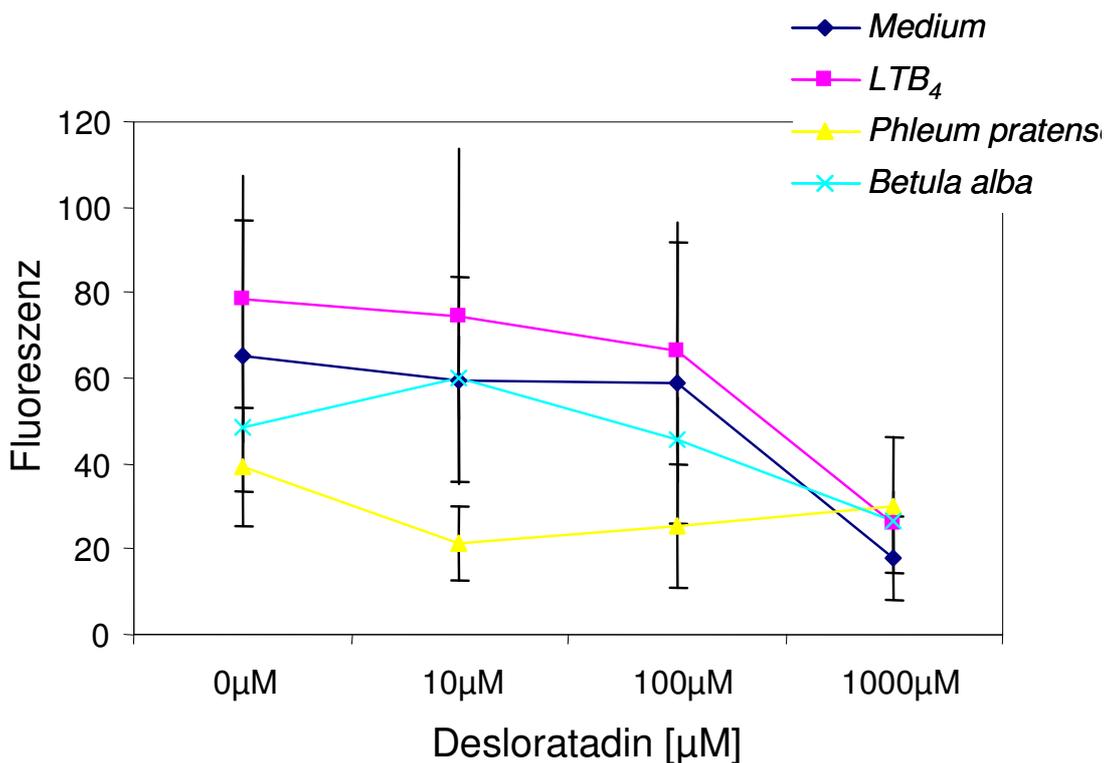


Abb. 5.2.2: Mittlere Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid-negativen Zellen, abzüglich der Fluoreszenz des Kontrollantikörpers. Dargestellt sind die gepoolten Daten von drei durchgeführten Experimenten. Die Fehlerindikatoren veranschaulichen die  $\pm$  SEM der Fluoreszenzintensitäten.

### 5.2.3 Hemmung der Degranulation von Neutrophilen durch Desloratadin

Neutrophile wurden mit Desloratadin der Konzentrationen 0-100 $\mu$ M vorinkubiert, um dann mit LTB<sub>4</sub>, wPE und Medium als Kontrolle stimuliert zu werden. Nach einer Stunde wurden die Zellüberstände asserviert. Die Auswertung erfolgte in einem radioaktiven ELISA (MPO-RIA, Pharmacia, Uppsala, Schweden).

In wiederholten Experimenten konnten wir zeigen, daß die Freisetzung von MPO dosisabhängig durch die Vorinkubation der PMN mit Desloratadin gehemmt wird. So führte bereits die Vorbehandlung der Zellen mit Desloratadin der Konzentration 0,01  $\mu$ mol zu einer nahezu 50%igen Reduktion der MPO-Freisetzung (Abb. 5.2.3). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Desloratadin anti-inflammatorische Wirkung auch über die Hemmung der Degranulation von neutrophilen Granulozyten ausübt.

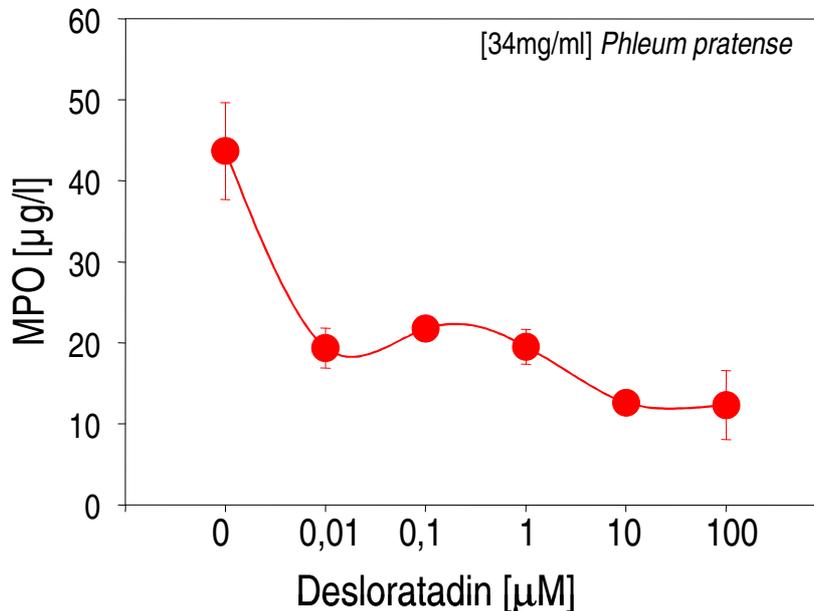


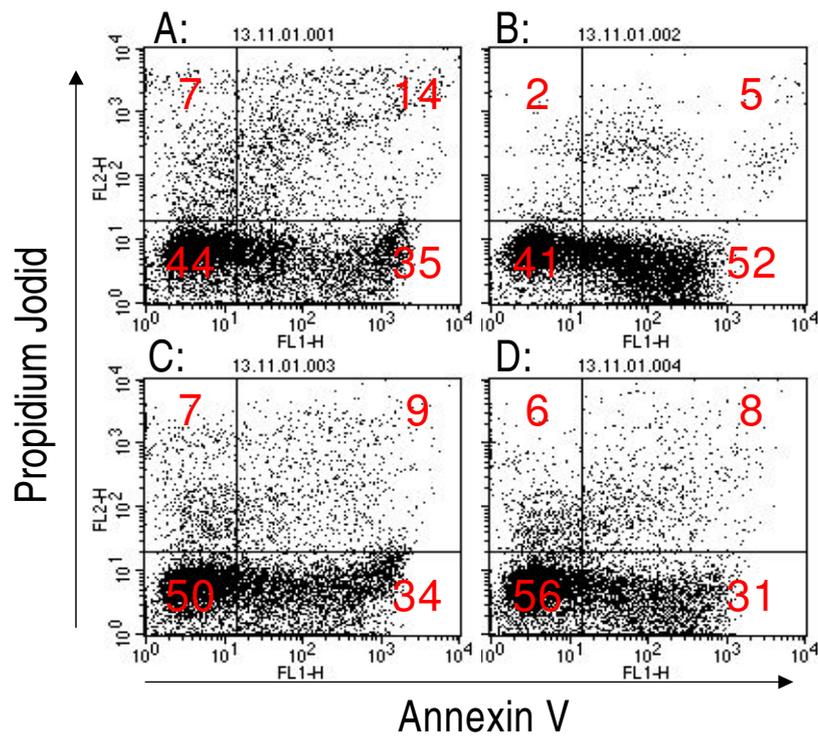
Abb.5.2.2-1: Freisetzung von Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten von Gräserpollen-Allergikern in Abhängigkeit zur Desloratadin-Konzentration, mit der die PMN vorinkubiert worden waren. Die Vorbehandlung der Zellen mit Desloratadin der Konzentrationen 0,01 $\mu$ M bis 100 $\mu$ M führte zu einer signifikanten Verringerung der MPO-

Freisetzung. Dargestellt sind die Daten eines für 3 durchgeführte Versuche repräsentativen Experiments.

#### **5.2.4 Toxizitätstests mittels Annexin V / Propidiumjodidfärbungen**

Zum Ausschluß von toxischen Effekten von Desloratadin auf neutrophile Granulozyten wurden klassische Apoptose-/Nekrose- Tests durchgeführt. Dazu wurden die Neutrophilen, im Anschluß an die Vorinkubation mit Desloratadin der Konzentrationen  $10^1$   $\mu\text{M}$  bis  $10^3$   $\mu\text{M}$  bzw. Medium, kombiniert mit Annexin V und Propidiumjodid (PJ) gefärbt. Diese Methode erlaubt es, apoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden und somit zu eruieren, ob die für die Wirkungsstudien verwendeten Desloratadin-Konzentrationen bei den PMN Apoptose bzw. Nekrose hervorrufen.

Hierbei stellte sich heraus, daß erst Konzentrationen ab  $10^3$   $\mu\text{M}$  zu einer erhöhten Induktion von Apoptose bei den Neutrophilen führen. Konzentrationen bis  $10^2$   $\mu\text{M}$  zeigten weder Apoptose-induzierende noch toxische Effekte. Daraus ergibt sich, daß die gezeigten Effekte von Desloratadin nicht durch Induktion von Apoptose zustande gekommen waren, da zur Vorinkubation der PMN Desloratadin-Konzentrationen  $<10^3$  verwendet worden waren.



**Abb. 5.2.4:** **A:**Medium, **B:** $10^3\mu\text{M}$  Desloratadin, **C:** $10^2\mu\text{M}$  Desloratadin, **D:**  $10^1\mu\text{M}$  Desloratadin. Die Zahlen entsprechen der prozentualen Verteilung der Zellen in den entsprechenden Quadranten, wobei vitale Zellen jeweils links unten, früh apoptotische Zellen rechts unten, spät apoptotische Zellen rechts oben und nekrotische Zellen links oben aufgetragen sind.

## 6 Diskussion

### 6.1 Wirkung von Polleninhaltsstoffen auf Neutrophile Granulozyten

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatten ergeben, daß Pollen nicht-allergene bioaktive Mediatoren bei Kontakt mit der wässrigen Phase rasch freisetzen [Behrendt, H. et al. 2001]. Diese Substanzen hatten Kreuzreaktionen im LTB<sub>4</sub>-ELISA gezeigt. Allerdings kann es sich bei diesen Mediatoren lediglich um LTB<sub>4</sub>-ähnliche Substanzen, nicht aber um LTB<sub>4</sub> selbst handeln, da in Pollen die Vorläufersubstanz von LTB<sub>4</sub>, die Arachidonsäure, nicht vorhanden ist. Eine wichtige Vorläufersubstanz für den Fettstoffwechsel von Pflanzen ist stattdessen die Linolsäure, die, wie in tierischen Zellen, über eine Lipoxygenase oder über Autooxidation (Abb. 6.1) verstoffwechselt wird [Feussner, I. et al. 1998]. Mittels HPLC wurden große Mengen an Linolsäure und deren Derivate in Birkenpollenextrakten nachgewiesen. Das Produkt der Linolsäure, das über die 13-Lipoxygenase gebildet wird 13-HODE war bereits 1991 von Henricks et al. als chemotaktische Substanz für neutrophile Granulozyten beschrieben worden [Henricks, P. A. et al. 1991].

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die gefundenen mit LTB<sub>4</sub> strukturverwandten Substanzen auch LTB<sub>4</sub>-ähnliche Wirkungen auf neutrophile Granulozyten ausüben.

Hierzu wurde der Einfluß der Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALM) auf diverse Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten wie Migration, Kalziumflußinduktion, CD11b-Expression und MPO-Freisetzung untersucht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß wässrige Extrakte von Birken- und Lieschgraspollen eine ähnlich starke chemotaktische Potenz aufweisen, wie das bekannte Chemotaxin LTB<sub>4</sub> [Ford-Hutchinson, A.W. et al. 1980], [Yokomizo, T. et al. 1997]. Auch die Lipidextrakte dieser beiden Pollenspezies führten zu einer signifikanten, jedoch schwächeren chemotaktischen Reaktion der PMN. Von Bedeutung hierbei ist, daß die chemotaktische Wirkung der HIP-Extrakte, die eine Vielzahl von Fettsäuren enthalten, ausgeprägter war, als die der weiter aufgereinigten RP-Phase-Extrakte, in welchen im Wesentlichen nur noch die

monohydroxylierten Fettsäuren vorkommen. Dieser Befund ist wahrscheinlich auf summative Effekte mehrerer chemotaktisch wirksamer Substanzen in dem Gesamtlipid-Extrakt (HIP) zurückzuführen. Auffällig dabei war jedoch, daß es zwischen Lipidextrakten der beiden Pollenspezies hinsichtlich der chemotaktischen Potenz nur geringe Unterschiede gab. Dies ist insofern von Bedeutung, als es der ursprünglichen Hypothese widerspricht, 13-HODE könne die für die Chemotaxis der PMN hauptverantwortliche Substanz in den Pollenextrakten sein. Die vielfach höhere Konzentration von 13-HODE und 13-HOTE sowohl in HIP- als auch RP-Phase-Extrakten von Lieschgras-Pollen gegenüber den Birkenpollen (vgl. Tab. 4.2.2.2-1 und 4.2.2.2-2), müßte sich auch in einer weitaus höheren chemotaktischen Potenz der Lieschgraspollen-Extrakte niederschlagen. In den von uns durchgeführten Versuchen dagegen wurden durch die Stimulation mit HIP-Extrakten von Birkenpollen höhere Migrationsindices erzielt (vgl. Abb. 5.1.1.4-1). Diese höhere chemotaktische Potenz der unspezifischeren wässrigen Extrakte könnte durch summative Effekte verschiedener Einzelsubstanzen bedingt sein.

Da wPE auch nennenswerte Mengen an Minor- und Majorallergenen enthalten [Behrendt, H. et al. 2001], mußte geklärt werden, ob die gezeigten Effekte durch Allergen-spezifische Mechanismen hervorgerufen wurden. Kürzlich wiesen Gounni et al. nach, daß Neutrophile IgE nicht nur über den niedrigaffinen IgE-Rezeptor (Fcε-RII/CD23) [Yamaoka, K.A. et al. 1996] und das Mac-2/IgE- bindende Protein [Yamaoka, A. et al. 1995], sondern auch über den heterotrimeren hochaffinen Rezeptor für IgE (Fcε-RI) bindern können [Gounni, A.S. et al. 2001], [Scholl, P.R., Geha, R.S. 1993], [Soussi-Gounni, A. et al. 1998].

Der Befund jedoch, daß die chemotaktische Potenz der Pollenextrakte für PMN von Atopikern wie von Kontrollpersonen gleich ausgeprägt war, läßt einen IgE-vermittelten Mechanismus unwahrscheinlich erscheinen. Dagegen sprechen außerdem die Ergebnisse von hier nicht gezeigten Migrationsassays unserer Arbeitsgruppe, die mit rekombinantem Phl p 5, dem Majorallergen von Lieschgraspollen (*Phleum pratense*), durchgeführt worden waren. Darin wurden die PMN mit Allergenkonzentrationen stimuliert, die auch in wPE gemessen worden waren [Behrendt H. et al. 2001]. Hierbei wurde keinerlei Chemotaxis beobachtet, was dafür spricht, daß die durch die Pollenextrakte vermittelte Migration

durch Allergen-unabhängige Mechanismen vermittelt wird.

Desweiteren konnte nachgewiesen werden, daß der LTB<sub>4</sub>-Rezeptor an der Vermittlung der Pollen-induzierten Chemotaxis beteiligt ist, da die Vorbehandlung der PMN mit dem selektiven LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten LY293111 zu einer Reduktion der Neutrophilenmigration gegen wässrige Pollenextrakte um bis zu 50% geführt hatte. In diesem Zusammenhang sind die von Yokomizo et al. erhobenen Befunde von Bedeutung, daß verschiedene Hydroxyeikosanoide am niedrigaffinen LTB<sub>4</sub>-Rezeptor (BLT2) binden können [Yokomizo, T. et al. 2001], was den Rückschluß erlaubt, daß dieser Rezeptor mit einem breiteren Spektrum an LTB<sub>4</sub>-ähnlichen Substanzen Bindungen eingeht.

Derselbe Versuch verdeutlicht überdies, daß LY293111 keinen Einfluß auf die durch IL-8 induzierte Chemotaxis der PMN hat. Daraus kann zum einen geschlußfolgert werden, daß LY293111 nicht generell die Fähigkeit der PMN zur Migration beeinträchtigt und somit nicht etwa toxisch für die Neutrophilen ist. Zum anderen macht das Experiment deutlich, daß LY293111 selektiv den LTB<sub>4</sub>-Rezeptor hemmt. Die chemotaktische Wirkung von IL-8 hingegen, die über den CXCR1 -/ 3- Rezeptor vermittelt wird, wird durch LY293111 nicht beeinträchtigt.

Die Stimulation sowohl mit wässrigen als auch mit Lipidextrakten führte daneben zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, wie sie auch durch Zugabe von LTB<sub>4</sub> erreicht wird. Dieser Befund spricht dafür, daß Pollenmediatoren an einen Rezeptor binden, dessen Aktivierung zu einer vermehrten intrazellulären Kalziummobilisierung führt, wie es auch beim LTB<sub>4</sub>-Rezeptor der Fall ist. Um diesen Verdacht zu erhärten, wurden Desensibilisierungsversuche durchgeführt, wobei PMN zuerst mit wPE und unmittelbar danach mit LTB<sub>4</sub> stimuliert wurden. Dabei zeigte sich, daß die Zugabe von LTB<sub>4</sub> bei PMN, die bereits mit Pollenextrakten stimuliert worden waren, zu keiner neuerlichen Kalziumflußinduktion führten, was dafür spricht, daß der LTB<sub>4</sub>-Rezeptor bereits durch Bindung von Pollenmediatoren desensibilisiert war.

In umgekehrter Reihenfolge hingegen, d.h. nach zuerst erfolgter Stimulation mit LTB<sub>4</sub>, konnte durch Zugabe von wPE noch ein geringer Kalziumfluß verzeichnet werden. Dies weist daraufhin, daß die aktivierende Wirkung der wPE möglicherweise

über verschiedene Rezeptoren vermittelt ist, bzw. daß sich darin verschiedene Substanzen befinden, die sich in ihren Effekten ergänzen. Die Ergebnisse dieser Desensibilisierungsversuche sprechen zunächst einmal für eine Strukturverwandtschaft der Lipidmediatoren in den wPE mit LTB<sub>4</sub>. Allerdings wäre auch denkbar, daß die gesehene Desensibilisierung des LTB<sub>4</sub>-Rezeptors gar nicht durch kompetitive Hemmung des Rezeptors selbst (homologe Desensibilisierung) zustande gekommen war, sondern durch sog. heterologe Desensibilisierung. Die sog. heterologe Desensibilisierung ist dann möglich, wenn verschiedene Rezeptoren in eine gemeinsame Endstrecke der Signaltransduktion münden. Unter diesen Bedingungen wäre denkbar, daß auch ein mit LTB<sub>4</sub> nicht strukturverwandter Stoff durch Interaktion mit einem anderen als dem LTB<sub>4</sub>-Rezeptor zu einem Verlust des Kalziumflusses auf LTB<sub>4</sub>-Stimulation führt.

Um also zwischen homologer und heterologer Desensibilisierung als Ursache für den Verlust der Kalziumflußantwort zu differenzieren, wurde der Kalziumfluß von Neutrophilen untersucht, die mit dem selektiven LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten LY293111 vorinkubiert worden waren. Im Anschluß an diese Vorbehandlung konnte weder durch LTB<sub>4</sub>, noch durch wPE eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration hervorgerufen werden, was für eine homologe Desensibilisierung spricht (Abb. 5.1.2.2).

Zur Beurteilung der Aktivierung im Rahmen des sog. „*Primings*“, durch Chemoattraktanzien wie LTB<sub>4</sub>, gehört auch die Expression von Adhäsionsmolekülen, die für die Emigration aus der Blutbahn in entzündetes Gewebe erforderlich sind. Für die Interaktion der neutrophilen Granulozyten mit den Endothelzellen ist das  $\beta_2$ -Integrin CD11b entscheidend. Wie wiederholte Versuche ergeben haben, führt die Inkubation der PMN mit wässrigen wie mit Lipidextrakten von Birken- und Gräserpollen zu einer signifikanten Hochregulierung der CD11b-Expression, wobei erneut die wässrigen Extrakte zu einer stärkeren Expression führten als die Lipidextrakte. Dagegen hatte die Inkubation der Zellen mit dem Majorallergen von Lieschgraspollen (*Phleum pratense*) Ph p5 keinerlei Einfluß auf die Expression dieses Integrins. Es wird also deutlich, daß nicht-allergene Pollen-assoziierte Mediatoren in der Lage sind, über die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen, die transmigratorische Potenz von

neutrophilen Granulozyten zu erhöhen.

Dies kann als weiteres Indiz dafür gewertet werden, daß die von Pollen freigesetzten Lipidmediatoren in Allergen-unabhängiger Weise proinflammatorisch wirken.

Als letzter Parameter für den Aktivierungszustand von neutrophilen Granulozyten, wurde deren Degranulationsverhalten, im Anschluß an die Vorbehandlung mit wässrigen und Lipidextrakten untersucht. Dazu wurde mittels Radioimmunoassay die Menge des aus den primären Granula freigesetzten zytotoxischen Enzyms MPO in Überständen von Zellsuspensionen bestimmt, die mit wässrigen Extrakten von Birken-, Lieschgraspollen- und Kiefernpollen, sowie mit Lipidextrakten von Birken- und Lieschgraspollen stimuliert worden waren.

Es zeigte sich, daß die wPE von Birken- und Lieschgras zu einer linearen, dosisabhängigen MPO-Freisetzung aus den PMN führten, während die Inkubation der Neutrophilen mit wPE von Kiefernpollen keine signifikante MPO-Freisetzung nach sich zog. Diese Ergebnisse sind gut mit dem bereits beschriebenen Befund vereinbar, daß aus Kiefernpollen, verglichen mit Birken- und Lieschgraspollen, weniger Eikosanoid-ähnliche Substanzen freigesetzt werden [Behrendt H, et al. 2001]. Auch die Lipidextrakte führten zu einer vermehrten MPO-Freisetzung, wobei die weiter aufgereinigten RP-Phase-Extrakte bei gleicher 13-HODE-äquivalenter Dosis, verglichen mit den HIP-Extrakten weniger degranulationsfördernd wirkten. Darüberhinaus fiel auf, daß die durch HIP-Extrakte hervorgerufene MPO-Freisetzung nicht streng dosisabhängig erfolgte. Stattdessen zeigten sich hinsichtlich der maximalen MPO-Freisetzung zwei *Peaks*, d.h. die maximale MPO-Freisetzung wurde zum einen bei einer 13-HODE-äquivalenten Dosis von  $1 \times 10^{-13}$  M sowie  $1 \times 10^{-9}$  M zum anderen erreicht. Dies deutet daraufhin, daß verschiedene Substanzen mit unterschiedlicher Wirkungskinetik zu der MPO-Freisetzung aus den PMN beigetragen haben könnten.

Die durch die reineren RP-Phase-Extrakte erzeugte MPO-Freisetzung dagegen stieg proportional mit der 13-HODE-Konzentration an. Dabei wurde mit der RP-Phase von Birkenpollen der 13-HODE äquivalenten Konzentration von  $1 \times 10^{-9}$  M

die höchste MPO-Freisetzung hervorgerufen.

Somit sprechen auch diese Ergebnisse für eine LTB<sub>4</sub>-agonistische, proinflammatorische Wirksamkeit von nicht-allergenen Mediatoren aus Pollen.

Festzuhalten ist also, daß PALM selbst in der Lage sind, Migration, Kalziumflußinduktion, Integrinexpression und Degranulation von PMN hervorzurufen. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse dieser Arbeit ist das Produkt der Linolsäure 13-HODE nicht die hauptverantwortliche Substanz für diese Aktivierung. Vielmehr scheint es so zu sein, daß mehrere, bislang nicht näher charakterisierte Derivate der mehrfach oxygenierten Fettsäuren in den Pollenextrakten für die gesehenen LTB<sub>4</sub>-agonistischen Effekte verantwortlich sein könnten.

Die analog zu den in tierischen Zellen in der Cyclooxygenasereaktion aus der Arachidonsäure gebildeten Prostaglandine, werden in pflanzlichen Zellen aus der Linolsäure durch Autooxidation die sogenannten Isoprostane gebildet (vgl. Abb.2.3.1-1). Von Imbusch und Mueller [*Imbusch, R. und Mueller, M. J. 2000*] wurden in frischen Birkenpollen Isoprostane in großen Mengen mittels HPLC nachgewiesen. In hier nicht gezeigten Migrationsassays unserer Arbeitsgruppe mit Isoprostanen, die uns von Prof. Dr. M.J. Mueller, Inhaber des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie des Julius-von-Sachs-Instituts für Biowissenschaften der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt worden waren, konnte keinerlei chemotaktischer Effekt auf neutrophile Granulozyten festgestellt werden. Dies spricht dafür, daß die chemotaktische Potenz der wPE eher durch die enthaltenen Leukotrien-ähnlichen Substanzen bedingt ist.

## 6.2 Bewertung der Relevanz der Ergebnisse für die allergische Reaktion

Die bisherige Lehrmeinung geht davon aus, daß ein spezifisches Allergen die allergische Reaktion initiiert und alle weiteren inflammatorischen Prozesse von intrinsisch aktivierten Substanzen unterhalten wird. Danach erfolgt die Sensibilisierung eines Organismus durch ein Allergen, das nach Überwindung der epithelialen Barriere von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) an der Zelloberfläche präsentiert wird [Vercelli, D. 1995]. Die APZ wandern zu den regionalen Lymphknoten und bewirken sodann die Aktivierung und Expansion Allergen-spezifischer T-Zellen, was die Amplifizierung und Persistenz der krankmachenden Immunreaktion zur Folge hat. Zusätzlich wirken die aktivierten T-Lymphozyten durch Freisetzung von Interleukinen (IL) (z.B. IL-3, IL-4 und IL-5) regulierend und/oder aktivierend auf eine Vielzahl von Zellen der allergischen Immunantwort (z.B. B-Zellen, Mastzellen, Basophile und Eosinophile Granulozyten). Im Gegensatz zu diesen allgemein anerkannten Mechanismen ist die Bedeutung der Zellen des innaten Immunsystems, insbesondere der neutrophilen Granulozyten in der frühen Phase der Typ 1- Reaktion noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion.

Eine Reihe von Hinweisen sprechen jedoch für eine aktive Beteiligung in der Initiierungsphase der allergischen Reaktion [Henson, P.M. und Borish, L.C. 1995], [Lim, M.C. et al. 1995], [Fahy, J.V. et al. 1995], [Kowalksi, M.L. et al. 1993]. All diese Befunde zielen im wesentlichen darauf ab, daß im Nasensekret von Atopikern deutlich mehr Neutrophile zu finden sind, als in dem von nicht-atopischen Kontrollpersonen. Allerdings läßt sich nicht ausschließen, daß diese Befunde lediglich Ausdruck der Neutrophilen-Infiltration im Rahmen der späten allergischen Entzündungsreaktion sind. Die Tatsache, daß Neutrophile von Atopikern wie von Nicht-Atopikern in derselben Weise auf die Stimulierung mit den Pollenmediatoren reagieren, spricht zunächst gegen eine Schlußfolgerung, daß diese Wechselwirkung eine Weichenstellung im Hinblick auf die Sensibilisierung darstellt.

Auf der anderen Seite ist nicht unwahrscheinlich, daß neutrophile Granulozyten

als Zellen der „ersten Verteidigungslinie“ möglicherweise doch bereits in der Frühphase mit dem Allergenträger in Kontakt treten. Die Befunde dieser Arbeit, daß von Pollen, den wichtigsten Allergenträgern der Außenluft, selbst Stoffe freigesetzt werden, die chemotaktisch und aktivierend auf Neutrophile wirken, eröffnet einen völlig neuen Ansatz für das Verständnis der Typ-I- Allergie. Dieser Ansatz würde der bisherigen Annahme widersprechen, daß die Unterhaltung der allergischen Entzündung nach Allergenkontakt von sensibilisierten Individuen, allein von intrinsisch aktivierten Substanzen unterhalten wird.

Die klinische Bedeutung des Befundes der Präsenz von Eikosanoid-ähnlichen Substanzen in Pollen wird auch dadurch unterstrichen, daß Pollen mit hoher allergener Potenz wie Birken- und Lieschgraspollen signifikant mehr Leukotrien B<sub>4</sub>-ähnliche Substanzen freisetzen als nicht-allergene Kieferpollen.

Die *in vitro* beschriebenen Allergen-unabhängigen Wechselwirkungen von Lipidmediatoren und Neutrophilen könnten *in vivo* möglicherweise adjuvante Effekte bei der Sensibilisierungs- und Auslösephase der allergischen Reaktion bedeuten, zumal, wie Behrendt et al. zeigen konnten, die Freisetzung der Lipidmediatoren nach Kontakt mit der wässrigen Phase zeitlich früher abläuft, als die Allergenfreisetzung selbst [Behrendt, H. et al. 2001].

So könnte die Aktivierung von Neutrophilen durch die von Pollen freigesetzten LTB<sub>4</sub>- oder PGE<sub>2</sub>-ähnlichen Substanzen (PALM<sub>LTB4</sub> bzw. PALM<sub>PGE2</sub>) über bislang unbekannte Mechanismen immunmodulatorische Einflüsse auf andere Immunzellen, etwa über Beeinflussung des Cytokinmilieus, nach sich ziehen. Eine solche Wirkung könnte insbesondere von den ebenfalls in den Pollenextrakten gefundenen PGE<sub>2</sub>-ähnlichen Substanzen ausgehen. Dies erscheint plausibel, da für die strukturell verwandten Prostaglandine bereits gezeigt werden konnte, daß sie über verschiedene Regelkreise immunmodulatorische Wirkungen in Richtung TH<sub>2</sub>-Reaktion ausüben können. So führt u.a. PGE<sub>2</sub> über eine Beeinflussung der Cytokinproduktion von T-Zellen [Demeure, C.E. et al. 1997] und APZ [Vieira, P.L. et al. 2000] zu einer verstärkten TH<sub>2</sub>-Antwort.

Die Leukotrien-ähnlichen Substanzen könnten auf andere Weise zu einer verstärkten Sensibilisierungsbereitschaft beitragen, indem sie die Gefäß- und

Epithelbarrierefunktion negativ beeinflussen, wodurch mehr Allergen in den Organismus aufgenommen werden könnte. Für LTB<sub>4</sub> selbst ist eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität bereits beschrieben worden [Björk, J. et al. 1983].

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch der von Behrendt et al. erhobene Befund, daß straßenverkehrsbedingte Luftverschmutzung zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von Lipidmediatoren aus Pollen führt. In Verbindung mit den Ergebnissen dieser Arbeit könnte man die Schlußfolgerung ziehen, daß verkehrsassoziierte Schadstoffe, wie Dieselrußpartikel, die allergene Potenz von Pollen erhöhen. Aufgrund des stetigen Zuwachses des Straßenverkehrs könnte eventuell sogar eine Relevanz für den Anstieg der Prävalenz allergischer Erkrankungen abgeleitet werden.

PALM könnten aber auch in einem anderem Zusammenhang eine Rolle als bioaktive Stoffe spielen. So wurde von Brunekreef et al. [Brunekreef, B. et al. 2000] in den Niederlanden eine signifikante Korrelation zwischen täglichen Unterschieden der Pollenkonzentration in der Außenluft mit der Zahl der Todesfälle aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung oder Pneumonien beschrieben. Als Erklärung für dieses Phänomen wurde die Hypothese aufgestellt, daß das inflammatorische Potenzial der Pollen als sehr kleine Partikel für die höheren Zahlen an Todesfällen bei dem beschriebenen Patientenkollektiv verantwortlich sein könnte. Eine alternative Hypothese könnte sein, daß bioaktive PALM zu diesem Effekt beitragen.

Die *in vitro*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Anlaß zu der Hypothese, daß Lipidmediatoren aus Pollen durch ihre chemotaktische Potenz zu einer Rekrutierung von Immunzellen *in vivo* führen, und somit am Entzündungsort aggravierend wirken können im Sinne einer Verstärkung der klinischen Symptomatik der allergischen Entzündung.

Dies bedeutet, daß künftig der Ausdruck „allergene Potenz“ neben der molekularen Allergenstruktur auch die Fähigkeit des Allergenträgers beinhalten müßte, durch Freisetzung proinflammatorischer Substanzen die Sensibilisierungsbereitschaft zu erhöhen bzw. die allergische Entzündungsreaktion zu verstärken.

Aus diesen Ergebnissen könnten sich auch therapeutische Schlußfolgerungen ergeben. Da der selektive LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonist LY293111 die proinflammatorischen Wirkungen der Polleninhaltsstoffe *in vitro* wirksam reduzierte, wäre es denkbar, daß damit auch zumindest die Symptome der allergischen Entzündung *in vivo* gelindert werden könnten.

### 6.3 Antiinflammatorische Potenz von Desloratadin

Derzeit sind die klassischen antiallergischen Medikamente nach wie vor die verschiedenen Histamin<sub>1</sub>- Rezeptorantagonisten. In den vergangenen Jahren wurden durch die Entwicklung neuer H<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten Fortschritte bei der Therapie allergischer Erkrankungen erzielt, die v.a. aus höherer Spezifität und Verringerung von Nebenwirkungen bei gleichzeitig verbesserter Wirksamkeit resultieren. Dies belegen zahlreiche klinische Studien der letzten Jahre [Day, J.H. et al. 1997]. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Befunde verschiedener *in vitro*- und *in vivo*- Studien, die insbesondere den neueren, selektiveren H<sub>1</sub>-Blockern antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, die nicht allein über ihre klassische Wirkungsweise als Antihistaminikum erklärt werden können [Hoffmann, K. et al. 1999], [De Vos, C. 1999].

Die bislang untersuchten antiallergischen Effekte verschiedener neuerer Antihistaminika beziehen sich u.a. auf die Hemmung von Chemotaxis [Fadel, R. et al. 1987], Mediatorfreisetzung von Effektorzellen des Immunsystems [Charlesworth, E.N. et al. 1989] oder Expression von Adhäsionsmolekülen, [Abdelaziz, M.M. et al. 2000], [Barody, F.M. und Naclerio, R.M. 2000]. In diesem Zusammenhang liegen bislang insbesondere für das selektive, nicht-sedierende Antihistaminikum der 3. Generation Desloratadin verschiedene Arbeiten über antiallergische Zusatzwirkungen vor. Dabei ist besonders die Hemmung der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-4, IL-6, IL-8 und IL-13 zu erwähnen, welche für die Entstehung von nasaler Obstruktion, Entzündung, Rötung und Juckreiz verantwortlich sind [Lippert, U. et al. 2000]. Auch die Antigen-induzierte

Histamin-Freisetzung aus Leukozyten wurde durch Desloratadin in einem Bereich zwischen 0,1  $\mu\text{mol/l}$  und 50  $\mu\text{mol/l}$  durchgehend dosisabhängig inhibiert [Kleine-Tebbe, J. et al. 1994]. Schroeder et al. konnten demonstrieren, daß Desloratadin der Konzentrationen [100 nmol/L bis 10 $\mu\text{mol/L}$ ] *in vitro* neben der IgE-induzierten, auch die IgE-unabhängige IL-4 und IL-13 -Bildung von humanen Basophilen hemmt [Schroeder, J.T. et al. 2001]. Ähnliche Befunde wurden von Genovese et al. vorgelegt. Danach inhibiert Desloratadin [300nmol/L bis 100 $\mu\text{mol/L}$ ] die Freisetzung von Histamin, PGD<sub>2</sub>, Leukotrien C<sub>4</sub>, Tryptase und dem TNF- $\alpha$  -induziertem Chemokin RANTES von humanen basophilen Granulozyten [Genovese, A. et al. 1997].

Auch an anderen nicht allergischen Effektorzellen (z.B. nasalen und bronchialen Epithelzellen, Endothelzellen, Keratinozyten) konnte eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen durch Loratadin und Desloratadin nachgewiesen werden [Bousquet, J. et al.1988]. In der Konzentration [10<sup>-5</sup> mol/L] verminderte Desloratadin die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM 1, durch nasale Epithelzellen. [Vignola, A.M. et al. 1995]. Außerdem zeigten Agrawal et al. , daß Desloratadin [10<sup>-7</sup> mol/L bis 10<sup>-5</sup> mol/L] die PAF-induzierte Chemotaxis von eosinophilen Granulozyten von Atopikern hemmt [Agrawal, D.K. et al. 2000].

Allerdings muß dazu gesagt werden, daß die *in vitro* verwendeten Desloratadinkonzentrationen z.T. deutlich über der therapeutischen Konzentration von [5mg/d  $\cong$  80-100nM] lagen. Trotzdem ist es eine nicht unwahrscheinliche Annahme, daß die gezeigten H<sub>1</sub>-Rezeptor-unabhängigen anti-inflammatorischen Effekte von Desloratadin klinisch relevant sein könnten [Raif, S. et al.2001].

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde nunmehr untersucht, welchen Effekt Desloratadin auf die Effektorfunktionen von Neutrophilen, wie Migration, Expression von Adhäsionsmolekülen bzw. Degranulation ausübt.

Dabei zeigte sich, daß die durch wPE bzw. LTB<sub>4</sub> hervorgerufene Chemotaxis bei einer Konzentrationen von 10 $\mu\text{M}$  Desloratadin signifikant inhibiert (bis zu 60%) wurde. Die Chemokinese, die auch ein Maß für die allgemeine Aktivierung der PMN ist, wurde schon bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{M}$  um bis zu 60% gehemmt, was auf die Empfindlichkeit der Neutrophilen für die

antiinflammatorischen Effekte des Antihistaminikums hinweist.

Der Einfluß von Desloratadin auf den Aktivierungszustand von PMN wurde darüber hinaus anhand der CD11b-Expression beurteilt. Diese Versuche ergaben, daß Desloratadin sowohl die konstitutive Expression (Medium) als auch die induzierte Expression von CD11b (LTB<sub>4</sub>, Pollenextrakte) dosisabhängig reduziert. Eine signifikante Hemmung der CD11b-Expression konnte jedoch erst bei einer Desloratadindosis von 1000µM erreicht werden. Bei dieser Dosis ist allerdings nicht auszuschließen, daß der gezeigte Effekt durch Induktion von Apoptose zustandegekommen sein könnte.

Diese Ergebnisse stehen mit dem gezeigten hemmenden Effekt des Antihistaminikums auf die Chemokinese der Neutrophilen in Einklang und könnten als weiteres Indiz dafür gewertet werden, daß Desloratadin den Aktivierungszustand der Neutrophilen negativ beeinflusst. Der Effekt von Desloratadin auf die Integrin-Expression auf Neutrophilen wirft Fragen bezüglich der Signaltransduktion bzw. der Verkopplung des Histamin- und Integrin-Signaltransduktionsweges auf.

Überdies führte die Vorbehandlung von mit wPE stimulierten Neutrophilen zu einer signifikanten Reduktion der MPO-Freisetzung gegenüber solchen Zellen, die statt mit Desloratadin nur mit seinem Lösungsmittel PBS vorbehandelt worden waren. Dabei genügte bereits die geringe Dosis von 0,01µM, um die MPO-Freisetzung um mehr als 50% zu mindern.

Um auszuschließen, daß die gezeigten Effekte durch Induktion von Apoptose bzw. durch toxische Effekte zustandegekommen waren, wurden Annexin V- / Propidiumjodid-Färbungen durchgeführt. Da erst die Vorbehandlung mit Desloratadin der Konzentration 1000µM zu einer Vermehrung der apoptotischen Zellen führte, kann davon ausgegangen werden, daß die mit niedrigeren Desloratadinkonzentrationen gezeigten Effekte, nicht etwa durch vermehrten Zelltod der PMN zustandegekommen waren.

Die Beobachtungen dieser Arbeit, aber auch die Befunde anderer Arbeitsgruppen, die antiinflammatorische Zusatzwirkungen für neuere Antihistaminika beschreiben, werfen einige Fragen auf. So ist z.B. ungeklärt, durch

welche Mechanismen diese Zusatzwirkungen vermittelt werden bzw., in wieweit die durchaus ähnlichen Zusatzwirkungen verschiedener Präparate über Strukturgleichheiten derselben erklärt werden können. Ein gemeinsames Strukturmerkmal vieler Antihistaminika ist ihre Lipophilie. Daraus ergibt sich eine Theorie bezüglich des Wirkungsmechanismus antiallergischer/ antientzündlicher Zusatzwirkungen von Antihistaminika, die besagt, daß sich die lipophilen Anteile der Substanzen in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran einlagern und so eine Stabilisierung der Membranstrukturen bewirken. Nach Singer und Nicolson werden biologische Membranen durch das „fluid-mosaic-model“ [Singer, S.J. und Nicolson, G.F. 1972] beschrieben. Nach diesem Modell befinden sich die Lipidphasen der Membran in einem „flüssig-kristallinen“ Zustand, d.h. die Lipidmoleküle, in der Hauptsache Phospholipide, sind sorgfältig geordnet, können aber hin- und herdiffundieren, was z.B. für Endo- und Exozytosevorgänge wichtig ist. Die Einlagerung einer lipophilen Substanz, könnte zu einer Abnahme der Fluidität der Membran führen, was wiederum eine Erschwerung des Exozytose-Vorgangs zur Folge hätte, die bis zur totalen Blockade der Exozytose und damit der Mediatorausschleusung reichen könnte. Dafür spricht auch die häufig nachgewiesene Supprimierung des Arachidonsäuremetabolismus durch neuere H1-Rezeptorenblocker [Amon, U. et al. 1993], [Ramachers, U. et al. 1996], [Baroody, F.M. und Naclerio, R.M. 2000]. Ramachers und Mitarbeiter konnten eine Korrelation zwischen der Lipophilie der Substanzen und der antiallergischen Wirksamkeit feststellen. Je lipophiler die Testsubstanzen waren, desto größere inhibitorische Effekte auf die Mediatorfreisetzung konnten gemessen werden [Ramachers, U. et al. 1996]. Für einen membranstabilisierenden Effekt sprechen daneben auch die Befunde dieser Arbeit, daß die Behandlung von Neutrophilen mit Desloratadin zu einer Verminderung der Expression des  $\beta_2$ -Integrins CD11b führt sowie, daß Desloratadin bereits in sehr geringen Dosen zu einer ausgeprägten Reduktion der MPO-Freisetzung führt.

Als weitere Erklärung der Prävention der Mediatorfreisetzung wird eine Beeinflussung des Kalziumeinstroms in die Zelle oder auch der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern vermutet [Tasaka, K. et al. 1986].

Darüber hinaus stellt sich die Frage nach der klinischen Relevanz der *in vitro*-Befunde, zumal die verwendeten Desloratadinkonzentrationen mit 10-100µM deutlich höher waren als die therapeutische Konzentration von 80-100nM. Um diese Frage sicher beantworten zu können, müssen erst noch großangelegte vergleichende Studien durchgeführt werden, in denen bestehende *in vitro*-Befunde mit den Effekten *in vivo* abgeglichen werden. Es müßte also im einzelnen untersucht werden, ob das Ausmaß der Reduzierung der migratorischen Potenz bzw. des Degranulationsverhaltens der neutrophilen Granulozyten einerseits mit dem klinischen Bild andererseits korreliert.

Zusammenfassend läßt sich jedoch sagen, daß die zahlreichen für Desloratadin gezeigten *in vitro*-Effekte durchaus auch eine mögliche Erklärung für die nachgewiesenermaßen [z.B. *Salmun, L.M. et al. 2000*] gute klinische Wirksamkeit des Präparats darstellen.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die von Pollen freigesetzten [Behrendt, H. et al. 2001], strukturell LTB<sub>4</sub>-ähnlichen Substanzen auch Leukotrien-ähnliche funktionelle Wirkungen auf humane neutrophile Granulozyten entfalten. In durchflußzytometrischen Untersuchungen wurde festgestellt, daß sowohl wässrige, als auch organische Extrakte, die reich an hydroxylierten Fettsäurederivaten der Linol- und Linolensäure sind, chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken. Darüberhinaus führt die Vorbehandlung von PMN mit diesen Pollenextrakten zur intrazellulären Kalziumfluß-Induktion, zur Hochregulierung der Expression des  $\beta_2$ -Integrins CD11b sowie zu einer gesteigerten Freisetzung des zytotoxischen Enzyms MPO. Der Vergleich der chemotaktischen Potenz von Extrakten verschiedener Pollenarten ergab, daß die Wirksamkeit der hochallergenen Pollen wie Birken- und Lieschgraspollen, verglichen mit wPE der weniger allergenen deutlich höher war. Diese Beobachtung ist gut vereinbar mit den Erkenntnissen aus Vorarbeiten, daß Birken- und Lieschgraspollen auch signifikant höhere Konzentrationen an LTB<sub>4</sub>-ähnlichen Substanzen enthalten als etwa Kiefernpollen.

Bemerkenswert ist, daß diese Effekte unabhängig vom Sensibilisierungsstatus des Patienten waren. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß der durch wässrige und Lipid-Extrakte vermittelten Chemotaxis und Aktivierung der Neutrophilen keine Allergen-spezifischen Mechanismen zugrundeliegen.

Darüberhinaus wurde gezeigt, daß die Vorinkubation der PMN mit dem LTB<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten LY293111 zu einer Hemmung der Chemotaxis gegen wPE bewirkte. Außerdem führte diese Vorbehandlung zu einem Verlust der Kalziumflußantwort auf Stimulation mit wPE. Diese Ergebnisse unterstreichen die Strukturverwandtschaft von Pollen-assoziierten Mediatoren mit LTB<sub>4</sub>. Bei den für die gezeigten Effekte verantwortlichen Substanzen handelt es sich wahrscheinlich um die in der HPLC identifizierten monohydroxylierten Derivate der Linol- und Linolensäure. Die anfängliche Hypothese, bei der für die gezeigten proinflammatorischen Effekte hauptverantwortlichen Substanz könne es sich um das Linolsäurederivat 13-HODE handeln, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht

bestätigt. Für eine genaue Identifizierung der verantwortlichen Substanzen müssen weiterführende Untersuchungen angestellt werden. Dies könnte auch von therapeutischem Nutzen sein, indem neue anti-allergische Medikamente entwickelt werden könnten, die unmittelbar bei der Inhibierung der Wirkung der LTB<sub>4</sub>-ähnlichen Substanzen ansetzen.

Die *in vitro* gezeigten Befunde dieser Arbeit sprechen dafür, daß nicht-allergene Polleninhaltsstoffe direkt zur Unterhaltung und Aggravation der allergischen Entzündung beitragen. Daraus ergibt sich ein neuer Ansatz für die Betrachtung der Typ I-Allergie, da die gezeigten Befunde der bisherigen Lehrmeinung widersprechen, daß ein spezifisches Allergen die allergische Reaktion initiiert und alle weiteren inflammatorischen Prozesse von intrinsisch aktivierten Substanzen unterhalten würden. Nach den vorliegenden Ergebnissen müßte künftig der Ausdruck „allergene Potenz“ - neben der molekularen Allergenstruktur - auch die Fähigkeit des Allergenträgers beinhalten, durch Freisetzung proinflammatorischer Substanzen die Sensibilisierungsbereitschaft zu erhöhen bzw. die allergische Entzündungsreaktion zu verstärken.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Wechselwirkungen von Pollen-assoziierten Lipidmediatoren mit neutrophilen Granulozyten durch Vorinkubation dieser mit dem Antihistaminikum der dritten Generation Desloratadin beeinflussbar sind. So wurde gezeigt, daß diese Vorbehandlung zu einer Hemmung der durch LTB<sub>4</sub> und wPE verursachten Chemotaxis und Chemokinese führte. Daneben reduzierte Desloratadin sowohl die konstitutive als auch die induzierte CD11b-Expression. Außerdem wurde mittels MPO-RIA nachgewiesen, daß Desloratadin die MPO-Freisetzung aus Neutrophilen Granulozyten hemmt.

Mit kombinierten Annexin V-/ Propidiumjodid-Färbungen konnte ausgeschlossen werden, daß die gezeigten Effekte durch Induktion von Apoptose oder Nekrose zustande gekommen waren.

Für die pharmakologische Klärung der Frage, über welche Mechanismen Desloratadin die gezeigten proinflammatorischen Wirkungen entfaltet, bedarf es jedoch weiterführender Studien.

## 8 Literaturverzeichnis

Aas, K., Aberg, N., Bachert, C., Bergmann, K., Bergmann, R., Bonini, S., Bousquet, J., de Weck, A., Farkas, I., Hejdenberg, K.

European Allergy White Paper: Allergic Diseases as a Public Health Problem.

The UCB Institute of Allergy, Brussels; 1997

Abdelaziz, M.M., Khair, O.A., Devalia, J.L.

The potential of active metabolites of antihistamines in the management of allergic diseases.

Allergy 55 (2000) 425-434

Affrime, M., Gupta, S., Banfield, C., Cohen, A.

A pharmacokinetic profile of desloratadine in healthy adults, including elderly.

Clin Pharmacokinetics 41 (2002); Suppl 1:13-9

Agrawal, D.K.

Pharmacology and clinical efficacy of desloratadine as an anti-allergic and anti-inflammatory drug.

Expert Opin Investig Drugs 10 (2001) 547-60

Amon, U., von Stebut, E., Wolff, H.H. (1993)

Pharmacological investigations with different PKC-inhibitors on IgE-dependent and IgE-independent activation of human basophils.

Agents Actions 39 (1993) 13-19

Anonym

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee.

Lancet 1998; 351:1225–1232

Anthes, J.C., Richard, C., West, R.E., Williams, S., Greenfelder, S., Gilcrest, H. Functional characterization of desloratadine and other antihistamines in human histamine H1 receptors.

Allergy 55 (2000) 277

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

Bacharier, L., Geha, R.

Molecular mechanisms of IgE regulation.

J Allergy Clin. Immunol. 105 (2000) 547-558

Bachert, C., Ganzer, U.

Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine bei der Rekrutierung von Entzündungszellen an der Nase.

Laryngorhinootologie 72 (1993) 585 – 589

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

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

Baggiolini, M.

Neutrophil activation and the role of interleukin-8 and related cytokines.

Int Arch Allergy Immunol 99 (1992) 196 – 199

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

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

Baroody, F.M., Naclerio, R.M.

Antiallergic effects of H1-receptor antagonists.

Allergy 55 (2000) 17-27

Behrendt, H., Becker, W.-M.

Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors.

Curr Opin Immunol 13(6) (2001) 709-715

Behrendt, H., Friedrichs, K.H., Krämer, U., Hitzfeld, B., Becker, W.M., Ring, J.

The role of indoor and outdoor air pollution in allergic diseases.

Prog Allergy Clin Immunol 3 (1995) 83–89

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

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

Bellavita, P.

The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes

Free Radic Bio Med 4 (1988) 225–261

Björk, J., Dahlén, S.E., Hedquist, P., Arfors, K.E.

Leukotrienes B<sub>4</sub> and C<sub>4</sub> have distinct microcirculatory actions in vivo.

Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 12 (1983) 1 – 6

Blackley, C.H.

Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus aestivus (hayfever or hay-asthma). London: Dawson's of Pall Mall (1959)

Blaser, K.

Die Rolle der T-Lymphozyten in Allergie und Asthma

Allergologie 16 (1993) 39-42

Bokoch, G. M.

Chemoattractant signaling and leukocyte activation

Blood 86 (1995) 1649-1660

Bootman, M.D., Berridge, M.J.

The elemental principles of calcium signalling.

Cell 83 (1995) 675

Borgeat, P., Samuelsson, B.

Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes unstable intermediate in formation of dihydroxy acids.

Proc Natl Acad Sci USA 76 (1979) 2148 – 2152

Borgeat, P., Naccache, P.H.

Biosynthesis and biological activity of leukotriene B<sub>4</sub>

Clin Biochem, 23 (1990) 459–468

Borregard, N., Cowland, J.B.

Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte

Blood 89 (1997) 3503-3521

Bousquet, J., Lebel, B., Chanal, I., Morel, A., Michel, F.B.

Antiallergic activity of H<sub>1</sub>-receptor antagonists assessed by nasal challenge.

J Allergy Clin Immunol 82 (1988) 881-7

Boyden, S.

The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes.

J Exp Med 115 (1962) 453-466

Braun-Fahrlander, C., Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F.H., Varonier, H.S., Vuille, J.C., Wüthrich, B.

Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community.

Clin Exp Allergy 29 (1999), pp. 28–34

Bray, M.A., Ford-Hutchinson, A.W., Smith, M.J.H.

Leukotrien B<sub>4</sub>: Biosynthesis and biological activities. In: SRS-A and leukotrienes, Piper, P.J. (Ed.), Wiley, Chichester, 1981, 253 – 270

Brunekreef, B., Hoek, G., Fischer, P., Spieksma, F.

Relation between airborne pollen concentrations and daily cardiovascular and respiratory-disease mortality.

Lancet 355 (2000) 1517–1518

Caillard, C.G., Mondot, S., Zundel, J.L., Julou, L.

Hypotensive activity of PAF-acether in rats.

Agents Actions 125 (1982) 725 – 730

Carafoli, E.

Intracellular calcium homeostasis.

Annu Rev Biochem 56 (1987) 396

Charlesworth, E.N., Kagey-Sobotka, A., Norman, P.S., Lichtenstein, L.M.

Effect of cetirizine on mast cell mediator release and cellular traffic during the cutaneous late-phase reaction.

J Allergy Clin Immunol 83 (1989) 905-912

Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strubing, C.

The TRP ion channel family.

Nat Rev Neurosci 2 (2001) 387–396

Coca, A.F., Cooke, R.A.,

On the classification of the phenomena of hypersensitiveness.

J Immunol 8 (1923), pp. 163–182

Cohen, D.M., Bhalla, S.C., Anaissie, E.J., Hester, J.P., Savary, C.A. und Rex, J.H.  
Effects of in vitro and in vivo cytokine treatment, leucopheresis and irradiation on  
the function of human neutrophils: implications for white blood cell transfusion  
therapy  
Clin Lab Haematol 19 (1997) 39–47

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

Condliffe, A.M., Kitchen, E. und Chilvers, E.R.:  
Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms  
Clin Sci (Lond.) 94 (1998) 461–471

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

Cox, G., Gauldie, J., Jordana, M.  
Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the  
survival of peripheral blood neutrophils in vitro  
Am J Resp Cell Mol Biol 7 (1992) 507-513

Custovic, A., Taggart, S.C.O., Woodcock, A.

House dust mite and cat allergen in different indoor environments.

Clin Exp Allergy 24 (1994) 1164–1168

Czarnetzki, B.M.

Increased monocyte chemotaxis towards leukotriene B<sub>4</sub> and platelet-activating factor in psoriasis and atopic eczema.

Clin Exp Immunol 54 (1983) 486 – 492

Dahlgren, C. und Follin, P.

Degranulation in human neutrophils primes the cells for subsequent responsiveness to the chemoattractant N-formylmethionylleucylphenylalanine but does not increase the sensitivity of the NADPH-oxidase to an intracellular calcium rise.

Biochim Biophys Acta 1052 (1990) 42–46

D'Amato, Spieksma, F.T.M, Liccardi, G., Jäger, S., Russo, M., Kontou-Fili, K., Nikkels, H., Wüthrich, B., Bonini, S.

Pollen-related allergy in Europe.

Allergy 53 (1998) 567 – 578

Davey, P.C., Zuzel, M., Kamiguti, A.S., Hunt, J.A., Aziz, K.A.

Activation-dependent proteolytic degradation of polymorphonuclear CD11b.

Br J Haematol 111 (2000) 934-42

Day, J.H., Briscoe, M.P., Welsh, A.

Onset of action, efficacy, and safety of a single dose of fexofenadine hydrochloride for ragweed allergy using an environmental exposure unit.

Ann Allergy Asthma Immunol 79 (1997) 533-540

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

De Vos, C.

H1-receptor antagonists: effects on leukocytes, myth or reality?

Clin Exp Allergy 29 (1999) 60-63

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

Diaz-Sanchez, D., Tsien, A., Fleming, J., Saxon, A.

Combined diesel exhaust particulates and ragweed allergen challenge  
markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and  
skews cytokine production to a helper cell 2type pattern

J Immunol 158 (1997) 2406–2413

Dinarello, C. A.

Proinflammatory cytokines

Chest 118 (2000) 503 – 508

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 – 102

DuBuske, L.M.

Second-generation antihistamines: the risk of ventricular arrhythmias.

Clin Ther 21 (1999) 281-95

Dykewicz, M.S., Fineman, S., Skoner, D.P., Nicklas, R., Lee, R., Blessing-Moore, J.

Diagnosis and management of rhinitis: complete guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology.

Ann Allergy Asthma Immunol 81(1998) 478-518

Edwards, S.W.

Neutrophils and host defence: The fight against infection.

In: Biochemistry and physiology of the neutrophil, 1–7. Cambridge University Press, 1994

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

Fadel, R., Heprin-Richard, N., Rihoux, J.P., Henocq, E.

Inhibitory effect of cetirizine 2HCL on eosinophil migration in vivo.

Clin Allergy 17 (1987) 373-379

Fadok, V., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M.

Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.

J Immunol 148 (1992) 2207-16

Fahy, J.V., Kim KW, Liu J, Boushey HA.

Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation.

J Allergy Clin Immunol 95 (1995) 843-852

Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M., Kindl, H.

All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipooxygenase.

FEBS Letters 431 (1998) 433 – 436

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 leukocyte

Nature 286 (1980) 264 – 265

Ford-Hutchinson, A.W., Piper, P.J., Samhoun, M.N.

Generation of leukotriene B<sub>4</sub>, its all trans isomers and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by rat basophilic leukaemia cells.

Br J Pharmacol 76 (1982) 215 – 220

Ford-Hutchinson, A.W.

Leukotriene B<sub>4</sub> in inflammation.

Crit Rev Immunol 10 (1990) 1 – 12

Freeland, H.S., Schleimer, R.P., Schulman, E.S., Lichtenstein, L.M., Peters, S.P.  
Generation of leukotriene B<sub>4</sub> by human lung fragments and purified human lung mast cells.

Am Rev Respir Dis 138 (1988) 389 – 394

Gassner-Bachmann, M., B. Wüthrich, B.

Bauernkinder leiden selten an Heuschnupfen und Asthma.

Dtsch Med Wochenschr 125 (2000), pp. 923–931

Geha, R.S., Meltzer, E.O.

Desloratadine: A new, nonsedating, oral antihistamine.

J Allergy Clin Immunol 107 (2001) 751-762

Genovese, A., Patella, V., De Crescenzo, G., De Paulis Spadaro G., Marone G.  
Loratadine and desethoxycarbonyl-loratadine inhibit the immunological release of mediators from human FcεRI<sup>+</sup> cells.

Clin Exp Allergy 27 (1997) 559-67

Goetzl, E.J., Pickett, W.C.

The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs)

J Immunol 125 (1980) 1789 – 1791

Goldman, D.W., Goetzl, E.J.

Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B<sub>4</sub>. Identification of subset of high affinity receptors that transduce the chemotactic response

J Exp Med (1984) 1027 – 1041

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

Grabbe, J., Rosenbach, T., Czarnetzki, B.M.

Production of LTB<sub>4</sub>-like chemotactic arachidonate metabolites from human keratinocytes.

J Invest Dermatol 85 (1985) 527 – 530

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

Grote, M.

In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites.

Int Arch Allergy Immunol 118 (1999) 1 – 6

Harvath, L.

Neutrophil chemotactic factors

Experientia. Supplementum 59 (1991) 35–52

Hauser, C.J., Fekete, Z., Livingston, D.H., Adams, J., Garced, M. und Deitch, E.A.

Major trauma enhances store-operated calcium influx in human neutrophils

J Trauma 48 (2000) 592–598

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

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

Henson, P.M., Borish, L.C.

Neutrophils mediators in asthma. In: Busse WW, Holgate ST, eds. Asthma and rhinitis. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1995:367–82

Henz, B.M.

The pharmacological profile of desloratadine: a review.

Allergy 56 (Suppl 65); (2001) 7-13

Hoffmann, K., Freitag, M., Altmeyer, P.

Loratadin bei atopischer Dermatitis: Ein Überblick über bisherige klinische Studien und Überlegungen zum Wirkmechanismus.

Derm 5 (1999) 18-30

Holgate, S., Church, M.

Allergy, Gower Medical Publishing, New York (1993)

Holgate, S. T., Church, M.K., Kapp, A.

Allergologie. Ullstein Mosby, Wiesbaden, Deutschland (1996) pp. 1-326

Howarth, P.H., Rajakulasingam, K., Feather, I.H.

Mediators in allergic Rhinitis.

Clin Exp Allergy 21 (1991) 262-266

Idriss, H.T., Naismith, J.H.

TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s).

Micros Res Tech 50 (2000) 184 – 195

Imbusch, R., Mueller, M. J.

Formation of isoprostane F2-like compounds (phytoprostanes F1) from  $\alpha$ -linolenic acid in plants.

Free Radic Biol Med 28 (2000) 720 –726

Jackson, W.T., Froelich, L.L., Boyd, R.J., Schrementi, J.P., Saussy, D.L., Schultz, R.M.

Pharmacologic actions of the second-generation leukotriene B4 receptor antagonist LY293111: in vitro studies.

J Pharmacol Exp Ther 288 (1999) 286-94

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

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

Johnson, P., Marsh, D.G.

“Isoallergen” from rye grass pollen.

Nature 206 (1965) 935-937

Kagey-Sobotka, A., MacGlashan, D.W., Lichtenstein, L.M.

Role of receptor aggregation in triggering IgE-mediated reactions.

Fed Proc 41 (1982) 12-16

Kamohara, M., Takasaki, J., Matsumoto, M., Saito, T., Ohishi, T., Ishii, H., Furuichi, K.

Molecular cloning and characterization of another leukotriene B4 receptor.

J Biol Chem 275 (2000) 27000 - 27004

Kanzow, G.

Hämatopoetisches System und Hämostasesystem – Blut.

In: Krück, F. (Herausgeber): Pathophysiologie Pathobiochemie,

(1994) 628–629. U & S

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 Int 2 (2000) 190

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J. et al.

Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine.

Science 266 ; 5189 (1994) 1395-9

Kinhult, J., Egestenw, A. , Benson, M., Uddman, R. and Cardell, L.O.  
Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen.

Clin Exp Allergy 33 (2003) 1141–1146

Kleine-Tebbe, J., Josties, C., Frank, G., Stalleicken, D., Buschauer, A., Schunack, W., Kunkel, G., Czarnetzki, B.

Inhibition of IgE- and non IgE-mediated histamine release from human basophil leucocytes in vitro by a histamine H1-antagonist, descarboethoxycarbonyl-loratadine.

J Allergy Clin Immunol 93(2) (1994) 494-500

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

Kowalksi, M.L., Grzegorzcyk, J., Sliwinska-Kowalska, M., Wojciechowska, B., Rozniecka, M., Rozniecki, J.

Neutrophil chemotactic activity (NCA) in nasal secretion from atopic and nonatopic subjects.

Allergy 48 (1993) 409-414

Krämer, U., Koch, T., Ranft, U., Ring, J., Behrendt, H.

Traffic-related air pollution is associated with atopy in children with atopy in children living in urban areas

Epidemiology 11 (2000) 64–70

Kreutzner, W., Hey, J.A., Barnett, A., Young, S., Tozzi, S.

Preclinical pharmacology of desloratadine, a selective and nonsedating histamine H1 receptor antagonist: 1<sup>st</sup> communication: receptor selectivity, antihistaminic activity, and antiallergic effects.

Arzneimittelforschung 50 (2000) 345-52

Kreutner, W., Hey, J.A., Chiu, P., Barnet, A.

Preclinical pharmacology of desloratadine, a selective and nonsedating histamine H1 receptor antagonist: 2nd Communication: Lack of central nervous system and cardiovascular effects

Arzneimittelforschung 50 (2000) 441-448

Kuehr, J., Frischer, T., Karmaus, W., Meiner, R., Barth, R., Herrmann-Kunz, E., Forster, J., Urbanek, R.

Early childhood risk factors for sensitization at school age.

J Allergy Clin Immunol 90 (1992), pp. 358–363

Kulig, M., Luck, W., Lau, S., Niggemann, B., Bergmann, R., Klettke, U., Guggenmoos-Holzmann, I., Wahn, U.

Effect of pre- and postnatal tobacco smoke exposure on specific sensitization to food and inhalant allergens during the first 3 years of life. Multicenter Allergy Study Group, Germany.

Allergy 55 (1999) 220-228

Lawrence, M. B., Springer, T. A.

Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins

Cell 31 (1991) 859 – 873

Le Souef, P.

Allergy in the Australian Aboriginal population.

ACI Int Suppl 1 (2000), pp. 43–45

Lim, M.C., Taylor, R.M., Naclerio, R.M.

The histology of allergic rhinitis and its comparison to cellular changes in nasal lavage.

Am J Respir Crit Care Med 151 (1995) 136-44

Lindberg, R.E., Pinnas, J.L., Jones, J.F.

Polleninduced chemiluminescence: Inhibition by serum from allergic individuals.

J Allergy Clin Immunol 69 (1982) 388–396

Lippert, U., Möller, A., Welker, P., Artuc, M., Henz, B.M.

Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1- and H2receptor antagonists.

Exp Dermatol 9 (2000) 118-124

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

Macfarlane, A.J., Kon, O.M., Smith, S.J., Zeibecoglou, K., Khan, L.N., Barata, L.T., McEuen, A.R., Buckley, M.G., Walls, A.F., Meng, Q., Humbert, M., Barnes, N.C., Robinson, D.S., Ying, S. and Kay, A.B.

Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin.

J Allergy Clin Immunol 105 (2000) 99-107

Mackay, J.A., Sass-Kuhn, S., Moqbel, R., Walsh, M., Kay, A.B.

The requirements for transferrin-independent adherence of human granulocytes to pollen grains.

Allergy 41 (1986) 169-179

Maggi, E.

The TH1/TH2 paradigm in allergy.

Immunotechnology 3 (1998) 233-244

Malech, H. L., Gallin, J. I.

Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases

N Engl J Med 317 (1987) 687-694

Malone, D.C., Lawson, K.A., Arrighi, H.M., Battista, C.

A cost of illness study of allergic rhinitis in the United States.

J Allergy Clin Immunol 99 (1997) 22-27

Markham, A., Wagstaff, A.J.

Fexofendine.

Drugs 55 (1998) 296-274

Marom, Z., Shelhamer, J.H., Bach, M.K., Morton, D.R., Kaliner, M.

Slow-reacting substances, leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> increase the release of mucos from human airway in vitro.

Am Rev Respir Dis 126 (1982) 449 – 451

Massey, W. A. 1993

Pathogenesis and pharmacologic modulation of the cutaneous late-phase reaction.

Ann Allergy 71 (1993) 578-584

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

Menger, M. D., Vollmar, B.

Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research

Br J Surg 83 (1996) 588-601

Mensing, H., Czarnetzki, B.M.

Leukotriene B<sub>4</sub> induces in vitro fibroblast chemotaxis.

J Invest Dermatol 82 (1984) 9 – 12

Metzger, H., Goetze, A., Kanellopoulos, J., Holowka, D., Fewtrell, C.

Structure of the high-affinity mast cell receptor for IgE.

Fed Proc 41(1982) 8-11

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

Monteseirin, J., Bonilla, I., Camacho, M.J., Conde, J., Sobrino, F.

IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients.

Clin Exp Allergy 31 (2001) 889-92

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

Niggli, V.

Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways.

Int J Cell Biol 35 (2003) 1619 – 38

Oxvig, C., Lu, C., Springer, T. A.

Conformational changes in tertiary structure near the ligand binding site of an integrin I domain

Proc Natl Acad Sci USA 96 (1999) 2215-2220

Palmblad, J., Malmsten, C.L., Üden, A.M., Radmark, O., Engstedt, L., Samuelsson, B.

Leukotriene B<sub>4</sub> is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence

Blood 58 (1981) 658 – 661

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

Panaro, M.A., Mitolo, V.

Cellular responses to fMLP challenging: a mini-review.

Immunopharmacol Immunotoxicol 21 (1999) 397–419

Petersen, A., Becker, W-M., Moll, H., Blümke, M. und Schlaak, M. Studies on the carbohydrate moieties of the timothy grass pollen allergen Phl p I.

Electrophoresis 16 (1995a) 869-875

Picker, L. J., Warnock, R. A., Burns, A. R., Doerschuck, C. M., Berg, E. L., Butcher, E. C.

The neutrophil selectin ELAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins EMLA-1 and GMP-140

Cell 66 (1991) 921-933

Pirquet, C.v.

Allergie.

Munch Med Wschr 30 (1906) 1457 – 1458

Plötz, S., Traidl-Hoffmann, C., Feussner, I., Kasche, A., Feser, A., Ring, J., Jakob, T., Behrendt, H.

Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators.

J Allergy Clin Immunol 113 (2004) 1152-1160

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

Raif, S., Geha, M.D., Meltzer, E.O.

Desloratadine: A new nonsedating, oral antihistamine.

J Allergy Clin Immunol 107 (2001) 751-62

Ramachers, U., Hiller, C., Nitschke, M., Dieckmann, M., Zhang, M.Q., Timmermann, H., Gibbs, B.F., Vollrath, I.B., Albrecht, C., Amon, U.

In vitro Untersuchungen mit Terfenadin und verschiedenen Derivaten zur Mediatorfreisetzung aus menschlichen Hautmastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten.

Allergo J 5 (1996) 447-452

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 A<sub>2</sub> release in polymorphonuclear leukocytes, macrophages and platelets: effect of IL-1 receptor antagonist

Mol Cell Biochem 159 (1996) 163 – 168

Reider, N., Zloczower, M., Fritsch, P., Kofler, H.

Antihistaminika. Teil1.

Hautarzt 49 (1998a) 674-681

Reider, N., Zloczower, M., Fritsch, P., Kofler, H.

Antihistaminika. Teil2.

Hautarzt 49 (1998b) 734-742

Riedler, J., Eder W., Oberfeld, G., Schreuer, M.

Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization.

Clin Exp Allergy 30 (2000), pp. 194–200

Ring, J.

Erstbeschreibung einer „atopischen Familien-Anamnese im Julisch-Claudischen Kaiserhaus: Augustus, Claudius, Britannicus.

Hautarzt 36 (1985) 470-474

Ring, J.

Klinik und Einteilung allergischer Erkrankungen. Geschichtliche Entwicklung.

In: "Angewandte Allergologie", Ring, J. (Hrsg.), MMW Taschenbuch, München, 1995, 2. Auflage, 13

Ring, J.

Pathomechanismen allergischer Reaktionen. IgE und Atopie.

In: "Angewandte Allergologie", Ring, J. (Hrsg.), MMW Taschenbuch, München, 1995, 2. Auflage, 17

Ring, J.

Pathomechanismen allergischer Reaktionen. IgE und Atopie.

In: "Angewandte Allergologie", Ring, J. (Hrsg.), MMW Taschenbuch, München, 1995, 2. Auflage, 27

Ring, J., Krämer, U., Schäfer, T., Abeck, D., Behrendt, H.

Environmental Risk Factors for Respiratory and Skin Atopy: Results from Epidemiological Studies in Former East and West Germany.

Int Arch Allergy Immunol 118 (1999) 403–407

Ring, J., Hein, R., Gauger, E., Bronsky, E., Miller, B.

Once-daily desloratadine improves the signs and symptoms of chronic idiopathic urticaria: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.

Int J Dermatol 40 (2001) 72-76

Ring, J., Kreml-Lamprecht, L.

Aerogene Allergene. Erfassung und Identifizierung.

MMW Münch Med Wochenschr 129 (1987)145-147

Roitt, I.

Typ V – Stimulatory hypersensitivity.

In: "Roitt's Essential Immunology", Roitt, I. (Ed.), Blackwell Science, 1997, ninth edition, 348 – 349

Ruzicka, T., Aulic, J.

Arachidonic acid metabolism in guinea pig Langerhans cells: studies on cyclooxygenase and lipoxygenase pathways.

Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res 17B (1987) 657 – 663

Salmun, L.M., Lorber, R.R., Danzig, M.R., Staudinger, H.

Desloratadine is safe and effective treatment for relief of seasonal allergic rhinitis.

Allergy (2000): 55 (Suppl 63); 268

Samuelsson, B., Borjesson, P., Hammarström, S., Murphy, R.C.

Introduction of a nomenclature: Leukotrienes.

Prostaglandins 17 (1979) 785 – 787

Sass-Kuhn, S.P., Moqbel, R., Mackay, J.A., Cromwell, O., Kay, A.B.

Human granulocyte/pollenbinding protein: Recognition and identification as transferrin.

J Clin Invest 73 (1984) 202– 210

Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A.

The neutrophil as a cellular source of chemokines

Immunol Rev 177 (2000) 195–203

Schleimer, R. P., Fox, C.C., Naclerio, R.M., Plaut, M., P. S. Creticos, A. G. Togias, J. A. Warner, A. Kagey-Sobotka, and L. M. Lichtenstein.

Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic diseases. J Allergy Clin Immunol 76 (1985) 369-374

Scholl, P.R., Geha, R.S.

Physical association between the high-affinity IgG receptor (FcγRI) and the subunit of the high-affinity IgE receptor (FcεRI).

Proc Natl Acad Sci U S A 90 (1993) 8847–50

Schroeder, J.T., Schleimer, R.P., Lichtenstein, L.M., Kreutner, W.

Inhibition of cytokine generation and mediator release by human basophils treated with desloratadine.

Clin Exp Allergy 31(9) (2001) 1369-77

Schubert, R., Wagner, G.

Botanisches Wörterbuch UTB-Verlag, Stuttgart (1993) 11. Auflage, 397

Seifert, R., Hoer, A., Offermanns, S., Buschauer, A., Schunack, W.

Histamine increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> in dibutyryl-cAMP-differentiated HL-60 cells via H<sub>1</sub> receptors and is an incomplete secretagogue.

Mol Pharmacol 42 (1992) 227 – 234

Seifert R., Hoer, A., Schwaner, I., Buschauer, A.

Histamine increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> in HL-60 promyelocytes predominantly via H<sub>2</sub> receptors with an unique agonist/antagonist profile and induces functional differentiation.

Mol Pharmacol 42 (1992) 235 – 241

Sengelov, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lolloke, K., Dahlgren, C., Borregaard, N. (1995)  
Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils

J Immunol 154 (1995) 4157-4165

Siegel, I., Shermann, W.B.

Pollen-white cell interactions.

J Allergy 45 (1970)133–145

Simons, F.E., Simons, K.J.

Clinical pharmacology of a new H<sub>1</sub> receptor antagonist.

Clin Pharmacokinet 36 (1999) 329-352

Singer, S.J., Nicolson, G.F.

The fluid mosaic model of the structure of cell membrane.

Science 175 (1972) 720-731

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

Shou, C.

Allergens in rhinitis: B- and T-cell epitopes of allergen molecules.

Clin Exp Allergy 25 (1995) 10 – 14

Simons, E. ed.

Ancestors in Allergy.

New York: Global Med Com, 1994

Snyder, F.

Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators

Am J Physiol 259 (1990) C697–C708

Sofia, M.J., Floreancig, P., Bach, N., Baker, S.R., Nelson, K., Sawyer, J.S.

The discovery of LY293111, a novel, potent and orally active leukotriene B4 receptor antagonist of the biphenylphenol class.

Adv Exp Med Biol 400A (1997) 381-6

Sonenthal, K. R., Shaughnessy, M. A.

An overview of allergens.

Allergy Proc 14 (1993) 106-107

Soussi-Gounni, A., Lamkhioued, B., Christodouloupoloulos, P., Nutku, E., Hamid, Q.  
Human neutrophils express the high affinity receptor for IgE (FcεRI).

J Allergy Clin Immunol 101 (1998) 173

SRU (Rat von Sachverständigen für Umweltfragen)

Umwelt und Gesundheit. Risiken richtig einschätzen.

Sondergutachten. Verlag Metzler Poeschel, Stuttgart (1998)

Stanley, R. G., Linskens, H. F.

Pollen: Biologie, Biochemie, Gewinnung und Verwendung. Urs Freund Verlag, Greifenberg (1985) 1 – 34, 188 – 205

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

Syndermann, R. und Goetzi, E.J.

Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis

Science 213 (1981) 830–837

Tamborini, E., Brandazza, A., De Lalla, C., Musco, G., Siccardi, A.G., Arosio, P. , Sidoli, A.

Recombinant allergen Lol p II: expression, purification and characterization.

Mol Immunol 32 (1995) 505-513

Tasaka, K., Mio, M., Okamoto, M.

Intercellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs.

Ann Allergy 56 (1986) 464-469

Tiku, K., Tiku, M.L., Skosey, J.L.

Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils

J Immunol 136/10 (1986) 3677 – 3685

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

Truong, M.J., Gruart, V., Kusnierz, J.P., Papin, J.P., Loiseau, S., Capron, A., Capron, M.

Human neutrophils express Immunglobulin 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

Van Cauwenberge, P., Bachert, C., Passalacqua, G., Bousquet, J., Canonica, G.W., Durham, S.R.

Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis.

Allergy 55 (2000) 116-34

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

van der, Stoep N., Korver, W., Logtenberg, T.

In vivo and in vitro IgE isotype switching in human B lymphocytes: evidence for a predominantly direct IgM to IgE class switch program.

Eur J Immunol 24 (1994) 1307-1311

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

Vercelli, D.

Molecular regulation of the IgE immune response.

Clin Exp Allergy 25 Suppl 2 (1995) 43-45

Vermes, I., Haanen, C., Reutelingsperger, C.

Flow cytometry of apoptotic cell death.

J Immunol Methods 243 (2000): 167-90

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

Vignola, A.M., Crampette, L., Mondain, M., Sauvere, G., Czarlewski, W., Bousquet, J.

Inhibitory activity of loratadine and descarboethoxyloratadine on Expression of ICAM-1 and HLA-DR by nasal epithelial cells.

Allergy 50 (1995) 200-3

Wakelin, M. W., Sanz, M. J., Dewar, A., Albelda, S. M., Larkin, S. W., Boughton, Smith, N., Williams, T. J., Nourshargh, S.

An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane

J Exp Med 184 (1996) 229-239

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

Weissmann, G., Korachak, H.M.

Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils

N Engl J Med 303 (1980) 27–3

White, M.V., Kaliner, M.A.

Mediators of allergic rhinitis.

J Allergy Clin Immunol 90 (1992) 699-704

WHO/IUIS (Allergen Nomenclature Subcommittee)

Allergen nomenclatur.

Bull World Health Org 72 (1994) 797 – 806

Wickmann, M., Emenius, G., Egmar, A.C., Axelsson, G., Pershagen, G.

Reduced mite allergen levels in dwellings with mechanical exhaust and supply ventilation.

Clin Exp Allergy 24 (1994), pp. 109–114

Yamaoka, A., Kuwabara, I., Frigeri, L.G., Liu, F.T.

A human lectin, galectin-3 (BP/Mac2), stimulates superoxide production by neutrophils.

J Immunol 154 (1995) 3479–87

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

Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takawa, Y., Shimizu, T.

A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis.

Nature 387 (1997) 620-4

Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T.

A second leukotriene B<sub>4</sub> receptor, BLT<sub>2</sub>. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders.

J Exp Med 192 (2000) 421-32

Yokomizo, T., Kato, K., Hagiya, H., Izumi, T., Shimizu, T.

Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B<sub>4</sub> receptor, BLT<sub>2</sub>.

J Biol Chem 276 (2001) 12454-9

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Dr. Heidrun Behrendt für die Überlassung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung und Förderung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Mein spezieller Dank gebührt daneben Frau PD Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann für ihre engagierte und ausdauernde Betreuung sowie die ständige Diskussionsbereitschaft während allen Arbeitsabschnitten, die entscheidend zum erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. med. Anna Kasche für die hervorragende Einführung in die Laborarbeit und die vielen wertvollen praktischen Ratschläge.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Dr. Ivo Feussner für die HPLC-Analysen der Birkenpollen bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Johanna Grosch für die Durchführung der MPO-Radioimmunoassays.

Für die freundschaftliche Atmosphäre und die Hilfestellung in vielfältiger Weise danke ich den Mitarbeitern des Zentrums Allergie und Umwelt, insbesondere Herrn Dr. med. Johannes Huss-Marp, Frau Cordula Ebner von Eschenbach, Frau Gabi Pleyl-Wisgickl, Frau Martha Grünefeld-Ruchholz, Frau Christine Weil, Frau Simone Knabl und Frau Alexandra Rizos.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung und die Ermöglichung dieses Studiums bedanken.

## **10 Lebenslauf**

Geboren als Sohn von Dr. med. Franz Huger, Zahnarzt, und Annelie Huger, Krankenschwester, am 25.07.1977 in München. Schulausbildung an der Grundschule Mühldorf a. Inn, und am Ruperti-Gymnasium in Mühldorf a. Inn.

Nach Ableistung des Zivildienstes im Kreiskrankenhaus Mühldorf, Beginn des vorklinischen Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München, anschließend klinischer Studienabschnitt bis zum Abschluß der Ärztlichen Prüfung an der Technischen Universität München. Seit März 2005 Anstellung als Assistenzarzt an der Klinik für Dermatologie und Allergologie im St.Josef-Hospital der Ruhr-Universität Bochum.