

Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie, GSF/TUM  
ZAUM, Zentrum für Allergie und Umwelt  
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein  
Technische Universität München

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

**Einfluss von organischen Umweltpartikeln auf die rBet v 1-induzierte  
Basophilenaktivierung birkenpollenallergischer Individuen**

Benedetta Christina Belloni

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. apl. Prof. Dr. B. Eberlein
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 17.04.2007 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.06.2007 angenommen.

**I Inhaltsverzeichnis**

<b>Kapitel</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
<b>II</b>	<b>Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit</b>	<b>III</b>
<b>III</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>IV</b>
1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeines zur Allergie	1
1.1.1	Immunologische Grundlagen	2
1.1.2	Ursachen allergischer Erkrankungen	4
1.2	Dieselrußpartikel und Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe	5
1.3	Basophile Granulozyten	6
2.	Zielsetzung und Strategie der Arbeit	9
2.1	Zielsetzung	9
2.2	Strategie	9
2.2.1	Organische Aerosolextrakte (AERex)	9
2.2.2	Allergenauswahl	9
2.2.2.1	Birkenpollenallergen	10
2.2.2.2	Rekombinantes Allergen	10
2.2.3	Auswahl des Testsystems	11
3.	Material und Methoden	13
3.1	Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
3.1.1	Geräte	13
3.1.2	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien	13
3.2	Rekombinantes Bet v 1	14
3.3	AERex	14
3.3.1	Sammlung von atomosphärischem Schwebstaub	14
3.3.2	Präparation der organischen Umweltextrakte	15
3.3.3	GC-MS Analyse	16
3.3.4	HPLC Analyse	16

---

3.3.5	Bestimmung von LPS in AERex	17
3.4	Patienten	17
3.4.1	Pricktest	18
3.4.2	Messung des spezifischen IgE	18
3.4.3	Blutentnahme	19
3.5	Basophilen-Aktivierungstest	19
3.5.1	Prinzip und Durchführung	19
3.5.2	Messung und Auswertung am Durchflußzytometer	20
3.5.3	Versuchsaufbau	21
3.6	Statistische Analyse	23
4.	Ergebnisse	24
4.1	Charakterisierung der Patienten	24
4.2	Charakterisierung von AERex	25
4.2.1	Qualitative Charakterisierung von AERex	25
4.2.2	Quantitative Charakterisierung von AERex	26
4.2.3	LPS Reaktivität in AERex	28
4.3	rBet v 1-induzierte CD63 Expression auf basophilen Granulozyten	29
4.4	Effekte von AERex auf die Basophilenaktivierung allergischer Probanden	30
4.5	Nichtallergisches Kontrollkollektiv	42
5.	Diskussion	43
6.	Zusammenfassung	51
<b>IV</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>V</b>	<b>Dank</b>	<b>XV</b>
<b>VI</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>XVI</b>
<b>VII</b>	<b>Anhang</b>	<b>XVII</b>

## II Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit

### Posterpräsentationen auf Kongressen:

#### Poster auf dem XXIII EAACI Kongress, Amsterdam, 12. - 16. Juni 2004

Belloni B, Schober W, Eberlein-Koenig B, Bohn P, Buters J and Behrendt H. Organic compounds of environmental aerosol: effects on rBet v 1 induced basophil activation.

Abstract Book Nr. 569, page 172

Junior Members Association Poster Prize.

#### Poster auf dem World Allergy Congress, München, 26. Juni – 1. Juli 2005

Lubitz S, Schober W, Belloni B, Eberlein-Koenig B, Lintelmann J, Behrendt H, Buters J. Organic extracts of urban aerosols, in particular PAHs, induce up-regulation of CD 63 in human basophils.

Abstract Book Nr. 1073, page 392

Schober W, Lubitz S, Belloni B, Eberlein-Koenig B, Brockow K, Huss-Marp J, Traidl-Hoffmann C, Lintelmann J, Behrendt H, Buters J. Allergy or Cancer? The Janus-faced role of diesel soot-associated PAHs in IgE-mediated hypersensitivity reactions.

Abstract Book Nr. 6, page 3

### Publikation:

Schober W, Belloni B, Lubitz S, Eberlein-König B, Bohn P, Saritas Y, Lintelmann J, Matuschek G, Behrendt H and Buters J.

Organic Extracts of Urban Aerosol ( $\leq$ PM<sub>2.5</sub>) Enhance rBet v 1-Induced Upregulation of CD63 in Basophils from Birch Pollen-Allergic Individuals. Toxicol Sci 90(2) (2006) 377-384.

**III Verzeichnis der Abkürzungen**

%	Prozent
Abb.	Abbildung
AERex	organisches Umweltextrakt
AERex <sup>1d</sup>	AERex an einem Tag gesammelt
AERex <sup>5d</sup>	AERex an fünf Tagen gesammelt
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
B[a]P	Benzo[a]pyren
Bet v 1	Betula verrucosa 1 Antigen
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAP	Kapazität
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CD63 <sup>+</sup>	CD63-exprimierende Zellen
DEP	Dieselrußpartikel
DEPex	organischer Dieselrußextrakt
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EPA	Environmental Protection Agency
evtl.	Eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
f-MLP	N-formyl-methionin-leucin-phenylalanin
GC	Gaschromatographie
gp	Glykoprotein
h	Stunde(n)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LPS	Lipopolysaccharide
m <sup>3</sup>	Kubikmeter

mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometer
nm	Nanometer
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphatpuffer
PM	Partikelmasse
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
rBet v 1	rekombinantes Bet v 1
rpm	Rounds per minute
RSV	Reaktive Sauerstoffverbindungen
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TH1	T-Helferzelle vom Typ 1
TH2	T-Helferzelle vom Typ 2
U	Units
vgl	vergleiche

## 1 Einleitung

### 1.1 Allgemeines zur Allergie

Der Begriff Allergie wurde 1906 von Clemens von Pirquet in die medizinische Terminologie eingeführt und beschreibt eine angeborene oder erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegenüber körperfremden, eigentlich unschädlichen Substanzen, die als Antigen erkannt werden. Die Entwicklung einer Allergie erfolgt nach einem klinisch stummen Erstkontakt in einer Sensibilisierungsphase, die mehrere Tage bis Jahre dauern kann. Bei erneutem Kontakt mit dem eigentlich harmlosen Antigen, kommt es zum Auftreten von Entzündungsreaktionen an verschiedenen Organsystemen, die lokal begrenzt oder generalisiert auftreten können. Besonders häufig betroffen sind Haut, Konjunktiven, Nasen-, Rachen-, sowie die Bronchialschleimhaut, also Grenzflächen, an denen sich die Auseinandersetzung des Organismus mit seiner Umwelt zunächst unmittelbar abspielt. Die Symptome sind sehr variabel und reichen von allergischer Rhinokonjunktivitis über allergisches Asthma bis hin zum anaphylaktischen Schock. Als Allergene werden Antigene bezeichnet, die eine allergische Immunantwort auslösen können [40].

1963 erfolgte die Einteilung der Allergien durch Coombs und Gell in vier Typen, je nach Pathomechanismus, wobei diese Formen nicht isoliert, sondern zum Teil parallel ablaufen oder ineinander übergehen.

Die häufigste Form und Gegenstand dieser Arbeit ist die Typ I Allergie, die durch Immunglobulin der Klasse E (IgE) vermittelt wird und nach erneutem Allergenkontakt innerhalb von Sekunden bis Minuten zu klinischen Symptomen führt. Nach diesem Muster verlaufen beispielsweise die allergische Rhinokonjunktivitis, das allergische Asthma bronchiale und die Nahrungsmittelanaphylaxie. Sie wird daher auch als *IgE-vermittelte Allergie vom Soforttyp* oder als *anaphylaktische Allergie* bezeichnet.

Reaktionen vom Typ II, auch *zytotoxischer Typ* genannt, entstehen durch zytotoxische Antikörper, die gegen zellwandständige Antigene (z.B. Medikamente) gerichtet sind. Durch Aktivierung von Komplement oder zytotoxischen Killerzellen kommt es zur Zytolyse körpereigener Zellen.

Bei Reaktionen des Typ III kommt es zur Bildung gewebeständiger oder zirkulierender Immunkomplexe, welche das Komplementsystem sowie neutrophile

Granulozyten und Thrombozyten aktivieren. Es kommt zur Phagozytose der Immunkomplexe unter Freisetzung von gewebeschädigenden Enzymen. Diese Form der Allergie wird auch als *Immunkomplextyp* oder *Arthus-Typ* bezeichnet.

Reaktionen vom Typ IV, auch *verzögerter Typ* oder *zelluläre Allergie* genannt, entstehen durch Freisetzung von Lymphokinen aus sensibilisierten Lymphozyten. Dies führt zur Aktivierung bzw. Proliferation von Makrophagen und mononukleären Zellen und hiermit zu einer Infiltration und Entzündungsreaktion am Ort der Antigenbelastung.

Später wurden noch die Typen V und VI hinzugefügt. Typ V beschreibt granulomatöse Reaktionen, die sich histologisch durch Epitheloidzellgranulome auszeichnen und nach Injektionen von Fremdstoffen im Verlauf von einigen Wochen entstehen.

Typ VI kommt durch spezifische pathogene Antikörper zustande, wie sie z.B. bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse oder bei der Myasthenia gravis vorkommen. Diese spezifischen Antikörper haben entweder stimulierende oder neutralisierende Wirkung auf die Effektororgane [45].

### 1.1.1 Immunologische Grundlagen

Bei der Immunität unterscheidet man eine angeborene Resistenz von adaptiver oder erworbener Resistenz. Die Widerstandsfähigkeit des menschlichen Organismus ist gegenüber bestimmten Erregern angeboren und unspezifisch. Dabei wird der Erreger anhand bestimmter Oberflächenstrukturen als fremd erkannt und eliminiert. Der Mensch ist also von Anfang an resistent gegen viele Mikroorganismen, gegen andere kann er Immunität erwerben (adaptive oder erworbene Immunität). Diese erworbene Resistenz ist spezifisch, d.h. erworbener Schutz besteht nur gegen den Erreger der die Krankheit verursacht. Die adaptive Immunität führt aber nicht nur zur Resistenz im engeren Sinn, sondern sie kann auch an der Pathogenese vieler Krankheiten beteiligt sein. Die Allergie gehört zu einer Gruppe von Immunphänomenen, wie z.B. auch Autoimmunerkrankungen, bei denen die krankmachenden Folgen im Vordergrund stehen. Es treten Schädigungen durch fehlgeleitete oder überschießende Immunreaktionen auf.



Eine Immunantwort erfolgt auf einen bestimmten immunologischen Reiz hin. Bei diesem Reiz handelt es sich meist um ein Protein, welches Antigen genannt wird. Die Antikörper sind sterisch dazu passende Immunrezeptoren, die das gefaltete Protein über Bereiche von etwa 8-15 Aminosäuren erkennen. Die an der Erkennung beteiligten Strukturelemente nennt man seitens der Antigene Epitope, seitens der Immunrezeptoren Antigenbindungsstellen. Der Immunapparat kann jedoch nicht durch das Epitop alleine stimuliert werden. Erst wenn das Epitop Bestandteil eines Makromoleküls ist, entsteht die immunisierende Wirkung [26].

Die Allergene werden von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und als Peptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert, so dass sie von T-Helferzellen (TH) erkannt werden. Als antigenpräsentierende Zellen fungieren unter anderem zirkulierende Monozyten, im Gewebe sessile Makrophagen, Langerhanszellen der Haut und interstitielle dendritische Zellen.

Innerhalb der T-Helferzellen unterscheidet man je nach Zytokin-Sekretionsmuster verschiedene Untergruppen, welche TH1 und TH2 genannt werden. Die T-Helferzellen erkennen auf den B-Lymphozyten die gleiche MHC-Klasse-II-Peptidkombination wie auf der antigenpräsentierenden Zelle, schütten Zytokine aus und aktivieren somit die B-Lymphozyten. Infektionen allgemein, beispielsweise bakteriell, durch intrazelluläre Parasiten, induzieren eine starke TH1-Antwort. Wurm- und andere extrazelluläre Parasitenerkrankungen führen früh zu IL-4-Freisetzung und damit zu einer TH2-Antwort. IL-12 fungiert als wichtigster Förderer der TH1-Zellen und hemmt TH2-Zellen, während IL-4 die TH2-Antwort fördert und die TH1-Zellen hemmt. Beim Allergiker findet auf dieser Ebene eine bisher nicht verstandene Fehlregulierung statt, die zu einer übermäßigen pathologischen TH2-Antwortbereitschaft führt. Die TH2-Zellen schütten wiederum vermehrt IL-4 aus und bewirken somit eine Differenzierung der aktivierten B-Zelle in eine IgE-produzierende Plasmazelle.

Das gebildete allergenspezifische IgE bindet an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) gewebständiger Mastzellen oder im Blut zirkulierender basophiler Granulozyten. Bei einem erneuten Kontakt bindet das Allergen an das allergenspezifische IgE. Sobald es zur Quervernetzung, das heißt Überbrückung zweier zellständiger IgE-Antikörper durch das Allergen kommt, wird eine Kaskade chemischer Reaktionen in Gang gesetzt, die zur Degranulation und Freisetzung präformierter biogener Amine (z.B. Histamin) aus Mastzellen und basophilen

Granulozyten führt. Gleichzeitig werden andere Mediatoren neu gebildet (z.B. plättchenaktivierender Faktor/PAF, Leukotriene und Prostaglandine). Die freigesetzten Mediatoren beeinflussen die glatte Muskulatur: Kontraktion vor allem in der Lunge (Bronchokonstriktion), Kontraktion postkapillärer Venolen und Erweiterung der Arteriolen sind die Folge [26, 45].

### 1.1.2 Ursachen allergischer Erkrankungen

Die Entstehung einer Allergie ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine genetische Prädisposition ist häufig bei Allergikern zu beobachten. Der Begriff Atopie wurde 1922 von Coca und Cooke eingeführt und beschreibt eine *familiär auftretende Neigung zur Entwicklung bestimmter Krankheiten (Rhinokonjunktivitis, Asthma, atopisches Ekzem) auf dem Boden einer Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten gegen Umweltstoffe, die meist mit erhöhter IgE Synthese assoziiert ist* [45]. Die Krankheit wird polygen vererbt und multifaktorielle Phänomene sowie modulierende Umwelteinflüsse sind für die Ausprägung von Bedeutung. Anscheinend wiegt bei genetischer Prädisposition der Einfluss der Mutter stärker als der des Vaters. Kinder atopischer Eltern haben ein Atopierisiko von 20-30% wenn nur ein Elternteil betroffen ist, im Gegensatz zu 30-40% zeigen beide Eltern unterschiedliche Manifestationen, bis hin zu 60-80% wenn beide Eltern dieselbe Manifestation aufweisen [45].

Als weitere Risikofaktoren für die Allergieentstehung haben sich ein höherer Sozialstatus der Eltern, sowie Tabakrauch- oder Verkehrsbelastung herausgestellt. Andererseits scheinen Kinder, die auf dem Bauernhof aufwachsen, weniger Allergien zu entwickeln [42, 45, 50].

Eine Zunahme der Allergien in den letzten Jahren vor allem in der westlichen Welt wurde in mehreren epidemiologischen Studien nachgewiesen [25, 43, 44, 49, 65]. Diese Zunahme lässt sich jedoch nicht allein durch die verbesserte Allergiediagnostik sowie eine erhöhte Aufklärung der Patienten bezüglich allergischer Erkrankungen und ihrer Symptome erklären [50]. Die zugrunde liegenden Ursachen sind Gegenstand laufender Studien, jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Kontrovers wird in diesem Zusammenhang die sogenannte Hygienehypothese diskutiert, die besagt, dass das Immunsystem aufgrund der verbesserten

hygienischen Verhältnisse der westlichen Welt in der Bekämpfung von parasitären Infektionen ungeübt, statt einer TH1 eine TH2-Immunantwort auf eigentlich harmlose Proteine begünstigt.

Ebenso Gegenstand der Diskussion und vieler Untersuchungen sind die Einflüsse von Umweltschadstoffen auf die Zunahme allergischer Erkrankungen in den letzten Jahren.

Epidemiologische Studien assoziierten die Exposition gegenüber atmosphärischen Umweltschadstoffen, wie z.B. Kraftfahrzeugemissionen, mit zunehmenden Symptomenkomplexen wie Asthma und allergischer Rhinokonjunktivitis [2, 8, 23, 29, 37, 49, 50]. Der Effekt von Deselemissionen auf die Pathophysiologie von allergischen Atemwegserkrankungen wurde ausführlich, sowohl im Tierversuch als auch an Patienten, mittels *in vivo* und *in vitro* Modellen untersucht [18, 20, 35, 47, 57]. Diese Untersuchungen wiesen eindeutig einen Zusammenhang zwischen dem Kontakt mit Deselemissionen und der Aktivierung einer IgE-abhängigen allergischen Entzündungsreaktion nach [60]. Weitere Studien wiesen einen Effekt der an Dieselrußpartikel gebundenen organischen Substanzen auf die allergeninduzierte Degranulation von Mastzellen [13] und auf spontane Histaminausschüttung und Zytokinproduktion in basophilen Granulozyten nach [11].

## 1.2 Dieselrußpartikel und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Einen wichtigen Anteil an der Luftverschmutzung tragen Dieselmotoremissionen. Sie enthalten mehrere tausend Einzelsubstanzen, die zum Teil gasförmig und zum Teil partikelförmig ausgestoßen werden. Es kommt zur Bildung eines Aerosols, der feinsten Verteilung fester und flüssiger Stoffe in Gas oder Luft. Von besonderer Bedeutung für die gesundheitliche Bewertung sind Dieselrußpartikel (DEP) und ihre assoziierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK). DEP bestehen aus Agglomeraten kohlenstoffhaltiger Rußpartikel sowie verschiedenen organischen Verbindungen, zusammengesetzt aus unverbrannten Kraftstoff-Kohlenwasserstoffen und Pyrolyseprodukten einschließlich PAK (siehe Abb.1). Die organischen Bestandteile sind fest an die Rußpartikel angelagert [1, 60].

Der Gehalt an PAK variiert je nach Sammelort und Jahreszeit, ebenso wie die Verteilung der PAK auf die verschiedenen Partikelgrößen. Bei der Aufnahme über

die Atmung in die Lunge spielt die Partikelgröße eine große Rolle. So kommt es bei ultrafeinen Partikeln zu einer viel höheren Ablagerung in der Lunge. DEP finden sich in der feinen und ultrafeinen Fraktion atmosphärischer Schwebstäube und sind vollständig alveolengängig. Durch die hohe Verweildauer aufgrund der schlechten Clearance ergibt sich eine besondere Expositionssituation der menschlichen Lunge [52].

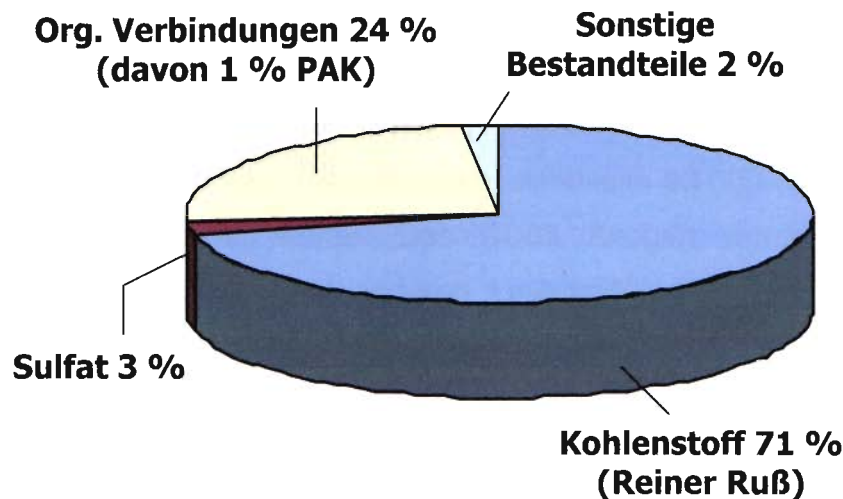


Abb.1: Dieselrußbestandteile

### 1.3 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten wurden erstmals 1879 von Paul Ehrlich beschrieben. Sie sind mit 0,5 bis 1% die seltensten zirkulierenden Leukozyten im Blut aber durch Blutabnahme sehr einfach zu gewinnen. Basophile Granulozyten enthalten zytoplasmatische Granula, welche sich mit basischen Farbstoffen anfärben lassen. Auch wenn ihre Existenz schon seit mehr als einem Jahrhundert bekannt ist, sind die Zusammenhänge ihrer physiologischen Rolle im Bereich der Immunologie noch nicht vollkommen erforscht. Es ist anzunehmen, dass Basophile, ebenso wie Neutrophile, Eosinophile, Makrophagen und Mastzellen, eine wichtige Rolle im Bereich der angeborenen Immunität gegenüber pathogenen Organismen spielen [19].

Ebenso wie auf Mastzellen, befinden sich auf der Zellmembran basophiler Granulozyten hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI), an welche das allergenspezifische IgE bindet. Eine Überbrückung der zellständigen IgEs durch korrespondierende

Antigene induziert eine Fusion der zytoplasmatischen Granula mit der Plasmamembran. Wie bereits oben beschrieben, kommt es dabei zu einer Freisetzung vielfältiger Mediatoren wie z.B. Histamin, Heparin, neutralen Proteinase, sauren Hydrolasen und chemotaktischen Faktoren, sowie zur Bildung von sekundären Mediatoren wie Leukotrienen und Zytokinen. Die Aktivierung der basophilen Granulozyten kann durch Messung der in das extrazelluläre Medium abgegebenen Mediatoren quantifiziert werden. Ebenso kann die Aktivierung der Basophilen aber auch durch Veränderungen an der Zelloberfläche, der Plasmamembran, gemessen werden.

Dies geschieht mittels eines monoklonalen Antikörpers (mAK). Dieser mAK erkennt ein Glykoprotein der relativen Molekularklasse 53.000 (GP53), welches der Gruppe CD63 zugeordnet wurde. Das CD63 Antigen wurde, neben den basophilen Granulozyten, auch auf anderen Leukozyten nachgewiesen. Bei der Klonierung wurden vier wahrscheinliche transmembrane Regionen gefunden und das Antigen als homolog zu einem melanomassoziierten Antigen beschrieben.

Bei inaktiven Basophilen wird der gebundene mAK fluoreszenzmikroskopisch hauptsächlich auf der Innenseite der Granulamembran gefunden. Bei aktivierten Basophilen bindet der mAK an exozytischen Ausstülpungen der Zelloberfläche. Daraus lässt sich schließen, dass bei ruhenden Basophilen das CD63 Antigen hauptsächlich an der Granulamembran zu finden ist, während die Aktivierung von Basophilen zu einer erhöhten Expression des CD63 Antigens auf der Plasmamembran führt. Wahrscheinlich ist das CD63 Antigen in der Granulamembran verankert und erst die Fusion der Granula mit der Plasmamembran führt zur Expression auf der Zelloberfläche [28].

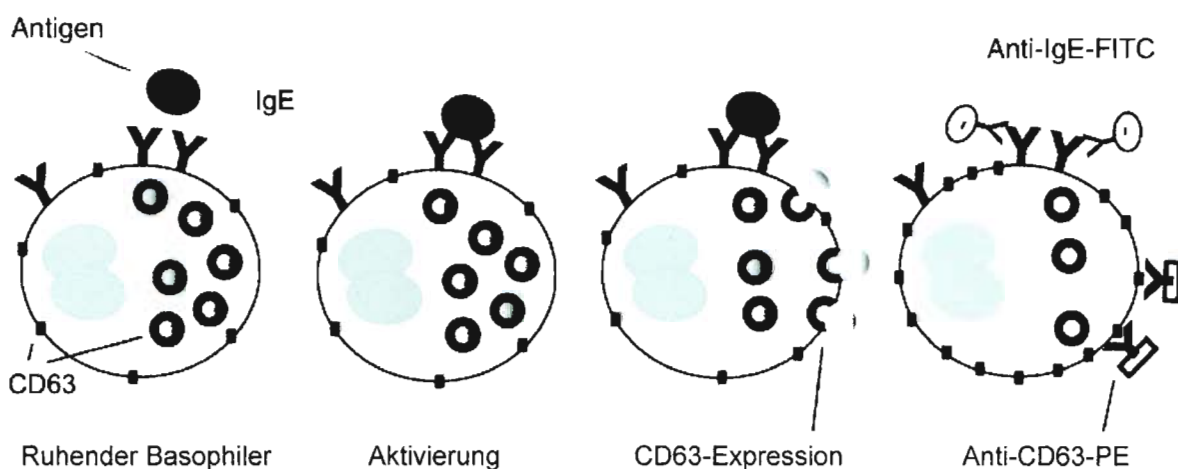


Abb.2: Basophilenaktivierung [17]

Die Kopplung des mAK an einen fluoreszierenden Farbstoff, macht diesen zu einem sehr nützlichen Werkzeug, um die Aktivierung basophiler Granulozyten durchflußzytometrisch zu bestimmen.

## 2 Zielsetzung und Strategie der Arbeit

### 2.1 Zielsetzung

Bisher wurde dem Einfluss organischer Komponenten von DEP auf IgE-vermittelte allergische Reaktionen wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Das Ziel der folgenden Arbeit war es, den Einfluss von verschiedenen organischen Umweltextrakten auf die Antigen-induzierte Aktivierung basophiler Granulozyten von Birkenpollenallergikern und gesunden, nicht atopischen Personen zu untersuchen. Eventuell vorhandene synergistische Effekte der partikelassoziierten organischen Komponenten und Bet v 1, dem bedeutendsten Birkenpollenallergen, auf die Basophilenaktivierung sensibilisierter Individuen sollten nachgewiesen werden.

### 2.2 Strategie

#### 2.2.1 Organische Aerosolextrakte (AERex)

Die Aerosolproben wurden direkt an einer stark befahrenen sechsspurigen Straße gesammelt. Diese simulierten idealerweise die Schadstoffbelastung der Luft, die von Menschen in stark verkehrsbelasteter Umgebung eingeatmet wird. Die Partikelgröße wurde durch einen Filter unter 2,5 µm gehalten, da besonders Partikel geringer Größe bis in die Lungenalveolen gelangen und dort abgelagert werden.

#### 2.2.2 Allergenauswahl

Als Allergen entschied man sich für ein aerogenes Allergen, welches über den Luftweg aufgenommen wird, ebenso wie das Schadstoffgemisch. Dadurch wurde versucht, der physiologischen Doppel- und Mehrfachbelastung des Körpers auf demselben Angriffsweg durch viele Substanzen gleichzeitig näherzukommen. Somit sollten mögliche additive oder synergistische Wirkungen untersucht werden.

### 2.2.2.1 Birkenpollenallergen

Birkenpollen spielen aufgrund des weitverbreiteten Wachstums des Baumes eine zentrale Rolle als Allergenquelle. Das bedeutendste Birkenpollenallergen *Betula verrucosa* (Bet v 1) ist darüberhinaus für einen Großteil der, in Mittel- und Nordeuropa sehr häufigen, birkenpollenverwandten Allergien verantwortlich und eignete sich daher besonders für die folgenden Untersuchungen. Birkenpollen sind botanisch mit den meisten Baumpollen wie zum Beispiel Erle und Hasel verwandt und zeigen aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit eine hohe Kreuzreaktivität mit diesen Pollen. Zusätzlich sind Kreuzallergien mit Sellerie, Apfel und anderen Nahrungsmitteln für einen großen Teil der Nahrungsmittelallergien verantwortlich [34, 59].

### 2.2.2.2 Rekombinantes Allergen

Natürliche Allergenextrakte sind komplexe Gemische, die, neben dem relevanten allergenen Protein in häufig unbekanntem Konzentrationen, nicht-allergene Proteine und Kohlenhydrate enthalten. Außerdem sind bestimmte Allergene in den natürlichen Extrakten nicht vertreten oder werden bei der Herstellung dieser Extrakte verändert. Rekombinante Allergene bieten den Vorteil, dass sie bezüglich Proteinkonzentration und IgE-Reaktivität eindeutig quantifiziert werden können. Während natürliche Allergenextrakte bei der Diagnosestellung lediglich eine Sensibilisierung des Patienten gegenüber bestimmten Allergenquellen identifizieren, kann eine Diagnose, die sich auf rekombinante Allergene stützt, präzise die krankheitsverursachenden Allergene und damit die individuellen Sensibilisierungsprofile der Patienten bestimmen [59, 61, 62]. Im Falle der Birkenpollenallergie wurde mehrfach gezeigt, dass ein einzelnes rekombinantes Allergen (Bet v 1) für eine verlässliche, standardisierte Diagnose der allergischen Erkrankung, mit einer Sensitivität von über 90% und einer Spezifität von 100%, ausreicht [59]. Daher wurde für die folgenden Experimente rekombinantes Bet v 1 gewählt.



### 2.2.3 Auswahl des Testsystems

Eine bereits länger bekannte, vielfach etablierte und optimierte Methode, die Basophilenaktivierung nachzuweisen, stellt die Messung der Histaminausschüttung dar. Der *Histamin-Release-Test* ist eine der häufigsten in der Routinediagnostik von Allergien verwendeten Methoden. Dieser Test beruht auf der Messung des in den Granula basophiler Granulozyten präformierten Mediators Histamin. Ausgangsmaterial können Vollblut oder aufgereinigte periphere Leukozyten sein. Es erfolgt die Inkubation der interessierenden Allergene oder meist anti-IgE als Positivkontrolle mit den Zellen. Eine Negativkontrolle wird mitgeführt. Darüber hinaus wird der Gesamthistamingehalt nach Zerstörung der Zellen bestimmt. Nach Beendigung der Inkubation der Allergene und Zentrifugation werden die Überstände aufbewahrt. In diesen Überständen wird Histamin spektrofluorometrisch oder mittels Enzymimmunoassay, früher als Radio-Immunoassay gemessen. Die Histaminfreisetzung wird in Prozent des Gesamthistamingehalts angegeben [64].

Durchflußzytometrie ermöglicht die Analyse von Oberflächenveränderungen an Zellen durch Markierung über an Fluorochrome gekoppelte Antikörper. *Basophilen-Aktivierungs-Tests* markieren Membranproteine auf basophilen Granulozyten, die nach Exposition gegenüber dem Allergen erscheinen. Diese Oberflächenveränderungen an Basophilen basieren auf einer *in vitro* allergeninduzierten Basophilenaktivierung. Durch Bindung eines mit Farbstoff markierten IgE-Antikörpers werden die basophilen Granulozyten markiert. Weitere farbstoffmarkierte Antikörper erkennen auf aktivierten Basophilen vermehrt exprimierte Glykoproteine. Hierfür stehen im Wesentlichen zwei Oberflächenmarker zur Verfügung: CD63 und CD203c, ein Typ II Transmembranprotein, welches auf Basophilen, Mastzellen und deren Vorläufern exprimiert wird und bei Allergenkontakt rapide hochreguliert wird [7].

Verschiedene Untersuchungen zum Vergleich der beiden Testsysteme wurden durchgeführt. Basophilen-Aktivierungs-Tests bieten den Vorteil der kürzeren Inkubationszeit, da das Plateau der Basophilendegranulation bereits nach 20 min erreicht wird. Weitere technische Vorteile bieten das benötigte geringere Blutvolumen, sowie die sofortige Analyse nach Durchführung des Tests, während beim Histamin-Freisetzungstest der Überstand für die Durchführung des Immunoassays aufbewahrt werden muss. Der Prozentsatz an aktivierten Basophilen

kann genau quantifiziert werden und umgeht somit die unspezifische Histaminausschüttung von anderen Quellen wie z.B. Thrombozyten. Basophilen-Aktivierungs-Tests bewiesen sich als sensitive und verlässliche Methode für die *in vitro* Quantifizierung der Basophilenaktivierung. Sensitivität und Spezifität waren vergleichbar gut mit Ergebnissen des Histamin-Release-Test [30, 46].

Als Testprinzip entschied man sich für den Basotest<sup>®</sup>, Orpegen Pharma, Heidelberg, der seit 1997 kommerziell erhältlich ist, da er eine sehr schnelle, etablierte und zuverlässige Methode darstellt, die Aktivierung der basophilen Granulozyten in heparinisiertem Vollblut zu messen [48].

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

##### 3.1.1 Geräte

Durchflußzytometer	FACSCalibur™, BD Biosciences, Heidelberg
Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	SW21, Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau

##### 3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Water	Sigma-Aldrich Chemie, München Best. Nr. W3500
Basotest-Kit	bestehend aus: Stimulationspuffer, Waschlösung, Positivkontrolle, Färbereagens, Lyse-Lösung Orpegen Pharma, Heidelberg Best. Nr. 10-0500
DMSO	Baker, Griesheim Best. Nr. 7157
Eppendorf Tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg Best. Nr. 0030015.002
Falcon Polystyrol-Röhrchen 5ml	BD Biosciences, Heidelberg Best. Nr. 352052
Falcon Polypropylen-Röhrchen 15/50ml	BD Biosciences, Heidelberg Best. Nr. 352070/352096
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA Size: 4" x 125'

S-Monovette 9ml LH

Sarstedt, Nümbrecht

Best. Nr. 02.1065

### 3.2 Rekombinantes Bet v 1

rBet v 1 (*Betula verrucosa*, birch pollen allergen 1, Biomay, Wien) ist ein lyophilisiertes, rekombinantes Protein mit IgE-Bindungskapazität. Es wurde durch heterologe Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*), gramnegativen Stäbchenbakterien, hergestellt. 99%ige Reinheit wurde durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 sichergestellt. Das lyophilisierte Protein wurde mit Reinstwasser zu einer Konzentration von 1mg/ml rekonstituiert und anschließend aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zum Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3 AERex

Sämtliche Herstellungsschritte der Umweltextrakte sowie die analytischen Untersuchungen erfolgten am Institut für Ökologische Chemie des GSF-Forschungszentrums für Gesundheit und Umwelt in Neuherberg, München unter der Leitung von Patrick Bohn sowie der Mitarbeit von Yücel Saritas, Jutta Lintelmann und Georg Matuschek.

#### 3.3.1 Sammlung von atmosphärischem Schwebstaub

Urbaner Feinstaub wurde mit Hilfe eines Andersen High-Volume Sampler (Andersen Instruments Inc., USA, mit einem  $2,5\ \mu\text{m}$  Probenkopf ausgestattet) gesammelt. Der Partikeldurchmesser betrug weniger als  $2,5\ \mu\text{m}$ .

Das Aerosol wurde auf einem Quarzfaserfilter (GF 20,  $203 \times 254\ \text{mm}$ , Schleicher & Schuell, Deutschland) gewonnen, welcher zuvor über mindestens drei Stunden auf  $500^{\circ}\text{C}$  erhitzt wurde. Die Luft wurde über einen Probenkopf der Größe PM 2,5 mit einer mittleren Geschwindigkeit von  $52\ \text{m}^3/\text{h}$  durch den Filter gezogen.

Es fanden zwei Sammlungen statt: Eine Ein-Tages-Sammlung (AERex<sup>1d</sup>) vom 20.02. bis 21.02.2003, mit deren Extrakt eine Pilotversuchsreihe gestartet wurde. Diese Sammlung ging über 23,93 h und entsprach einem Luftvolumen von 1270 m<sup>3</sup>. Eine zweite, längere Probennahme erstreckte sich vom 05.06. bis 10.06.03. Die Fünf-Tages-Sammlung (AERex<sup>5d</sup>) über 119,89 h entsprach einem Luftvolumen von 6230 m<sup>3</sup>. Alle Proben wurden neben einer dicht befahrenen sechsspurigen Straße (Ingolstädter Landstrasse: 44000 Kraftfahrzeuge/Tag, persönliche Mitteilung des Planungsreferates München) in München gesammelt.



Abb.3: Sammelort: GSF-Forschungsgelände, Neuherberg, München.

#### 3.3.2 Präparation der organischen Umweltextrakte

Ein Drittel des 1-Tage- und zwei Drittel des 5-Tage-Filters wurden mittels Wasserdampfdestillation extrahiert. Die Filter wurden jeweils mit 250 ml Wasser in einem Kolben zwei Stunden lang auf 100°C erhitzt. Der Wasserdampf kühlte bei der Passage durch einen Liebig-Kühler ab. Das wässrige Kondensat wurde mittels Überführung in eine Hexanphase extrahiert. Nach zwei Stunden wurde der Vorgang abgestoppt und die Hexanphase entfernt. Um beide Extrakte vergleichbar zu machen wurde AERex<sup>1d</sup> 100 µl DMSO und AERex<sup>5d</sup> 1 ml DMSO hinzugefügt. Das Hexan wurde unter Stickstoff bei 40°C verdampft, wodurch zwei organische Extrakte mit ähnlichen Luftäquivalentkonzentrationen pro ml entstanden.

### 3.3.3 GC-MS Analyse

Die GC-MS Analyse wurde mit Hilfe eines Hewlett-Packard GC-MS Systems (GC 6890 Serie, 5973N mass selective detector) durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde im vollen Scan Modus ( $m/z$  35 – 400) mit Ionisierung durch Elektronenaufprall betrieben. Die chromatographische Trennung wurde durch Benutzung einer 30,0 m DB-5ms Säule mit 0,25 mm id und 0,25  $\mu$ m Filmdicke erreicht (J&W Scientific, Rancho, Cordova, CA). Die Injektion erfolgte kontinuierlich. Die Ofentemperatur stieg von 55°C um 10 K pro Minute bis auf 300°C an, die für 15 Minuten gehalten wurden. Die Identifikation der Einzelsubstanzen basierte auf dem Vergleich ihrer Retentionszeiten und Massenspektren mit denen reiner Standardsubstanzen.

### 3.3.4 HPLC Analyse

Um die Varianz der PAK Komponenten von AERex<sup>1d</sup> (Ein-Tages-Sammlung im Winter) und AERex<sup>5d</sup> (Fünf-Tages-Sammlung im Sommer) zu untersuchen, wurde eine quantitative HPLC Analyse durchgeführt. Dies ist eine der sensitivsten und selektivsten analytischen Methoden um PAK zu bestimmen. Nachweisgrenzen im niedrigen Picogrammereich pro Mikroliter können leicht erreicht werden [31].

Es wurde hierfür ein HPLC System HP 1100 (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland), ausgestattet mit Dioden Array- und Fluoreszenzdetektor, verwendet. Die analytische Säule (MZ-PAH C-18, 5  $\mu$ m, 250 mm, 3 mm id) wurde von MZ Analystechnik, Mainz, Deutschland erworben. Die PAKs wurden mit einem Acetonitrilgradienten bei 308 K und 0,5 ml/min aufgetrennt: Die Trennung startete mit 58 % Acetonitril, der organische Lösungsmittelgehalt wurde innerhalb von 35 min auf 100 % gesteigert und bei 100 % Acetonitril über die letzten 12min gehalten. Während der folgenden 2 min wurde die initiale Elutionszusammensetzung erreicht und das System für 15 min equilibriert. Das Injektionsvolumen betrug 10  $\mu$ l. Detektion und Quantifizierung der PAKs wurde mit zeitgesteuerter Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Die HPLC Methode wurde extern in Konzentrationen von 2 pg/ $\mu$ l bis zu 100 pg/ $\mu$ l für die Quantifizierung von 18 PAKs, davon entstammten 15 der U.S. EPA „Priority pollutant“-Liste, kalibriert. Die resultierenden Korrelationskoeffizienten der Kalibrationskurven (n=6) lagen alle höher als 0,999.

### 3.3.5 Bestimmung von LPS in AERex

LPS wurde mit Hilfe des Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Assay (Cambrex Bio Science, Apen, Deutschland) gemessen. Die AERex Proben wurden in DMSO bereitgestellt und in einer 1:100 Verdünnung in LPS freiem Wasser getestet. Die 1 % DMSO Trägersubstanz zeigte keine Beeinflussung des LAL Test Systems. Escherichia coli Standard diente als Positivkontrolle.

### 3.4 Patienten

Getestet wurde das Blut von sechs Birkenpollenallergikern (w=4, m=2) im Alter zwischen 21 und 39 Jahren (Durchschnittsalter  $28,5 \pm 7,9$  Jahre). Die Diagnose der Birkenpollenallergie wurde durch die klinische Anamnese der allergischen Rhinokonjunktivitis, einen positiven Pricktest auf Birkenpollen sowie spezifisches IgE gegen Birke und rBet v 1 (CAP-Klasse  $\geq 3$ , spezifisches IgE  $\geq 3,50$  kU/l, UniCAP<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Deutschland) gestellt. Alle Teilnehmer hatten 15 Tage vor Blutentnahme weder Antihistaminika noch Glukokortikosteroide zu sich genommen. Alle freiwilligen Blutspender wurden in die Studie aufgenommen nachdem sie ihr schriftliches Einverständnis gegeben hatten. Die Studie erfolgte nach den Leitlinien der Deklaration von Helsinki. Das Kontrollkollektiv bestand aus fünf Nichtallergikern (w=3, m=2) im Alter zwischen 23 und 32 Jahren (Durchschnittsalter  $27,2 \pm 4,1$  Jahre). Die Identifizierung erfolgte durch negativen Pricktest, Gesamt IgE von  $< 25$  kU/l und niedrigem spezifischen Serum IgE (CAP-Klasse 0, spezifisches IgE  $\leq 0,34$  kU/l) gegen Birke und Bet v 1, sowie 10 weiteren Standardallergenen (Dermatophagoides pteronissinus, Katzenepithelien, Hühnereiweiß, Milcheiweiß, Dorsch, Weizen, Sellerie, Latex, Lieschgras, Beifuß) (siehe Tab.1). Die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigte die Studie.

### 3.4.1 Pricktest

Die Durchführung des Pricktest erfolgte entsprechend der üblichen Methodik [15, 43], mittels Applikation eines Tropfen wässrigen Birkenpollenextraktes (Allergopharma, Reinbek, Deutschland) am volaren Unterarm. Danach wurde die Haut mittels einer standardisierten Prick-Nadel mit definierter Eindringtiefe angestochen. Nach 15 Minuten wurde die Testlösung abgewischt und die Reaktion abgelesen. Eine Quaddelbildung von einem Durchmesser größer als 3 mm, sowie eine Erythembildung mit Durchmesser größer als 5 mm, zählte als positives Ergebnis (Abstufung siehe Tab.1). Die Positivkontrolle wurde mit 0,1 % Histamin durchgeführt und die Negativkontrolle mit 0,9 % NaCl.

Grad	Erythemdurchmesser (mm)	Quaddeldurchmesser (mm)
0	< 5	< 3
±	5 - 10	3 - 10
+	11 - 20	3 - 10
++	21 - 30	3 - 10
+++	31 - 40	10 - 15 oder Pseudopodien
++++	> 40	> 15 oder viele Pseudopodien

Tab.1: Abstufungsbewertung des Pricktests, modifiziert übernommen aus [16]

### 3.4.2 Messung des spezifischen IgE

Der CAP-Test dient dem hochempfindlichen Nachweis von spezifischem IgE im Patientenserum. Das relevante Allergen ist kovalent an ein hydrophiles Träger-Polymer gebunden. Spezifisches IgE der Probe bindet an dieses Allergen und wird mittels monoklonalen und polyklonalen, mit fluoreszierender  $\beta$ -Galaktosidase markierten, anti-IgE (Fc) Antikörper nachgewiesen [40]. Die Ergebnisse werden üblicherweise semiquantitativ nach Klassen angegeben (siehe Tab 2): 0 = negativ, 1 = sehr schwach positiv, 2 – 6 = positiv, mit steigender Intensität [44].

Die Messung erfolgte mittels fluoreszierendem Immunoassay nach der Anleitung des Herstellers (UniCAP<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Germany). Die Messung



wurde sowohl mit Birkenpollenextrakt als auch mit r Bet v 1 durchgeführt (siehe Tab.3).

Beurteilung	Klasse	Spezifisches IgE (kU/l)
negativ	0	< 0,10
grenzwertig	0	0,10 – 0,34
sehr schwach positiv	1	0,35 – 0,69
schwach positiv	2	0,70 – 3,49
positiv	3	3,50 – 17,49
Stark positiv	4	17,50 – 49,99
sehr stark positiv	5	50,00 – 99,99
sehr stark positiv	6	≥ 100,0

Tab.2: Beurteilung der CAP-Klassen, Routinediagnostik der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

### 3.4.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte an peripheren Venen mittels 9 ml Monovetten. Als Gerinnungshemmer fungierte ausschließlich Lithium-Heparin. Die Blutentnahme erfolgte jeweils unmittelbar vor der Durchführung des Basotest®.

## 3.5 Basophilen-Aktivierungstest

### 3.5.1 Prinzip und Durchführung

Für jeden Testansatz wurden 100 µl heparinisiertes Vollblut in 5ml Falcon Tubes pipettiert und zunächst für 10 min bei 37°C mit 20 µl Stimulationspuffer, der Interleukin 3 enthielt, inkubiert. Anschließend wurden einem Röhrchen 100 µl der Positivkontrolle, die das chemotaktische Peptid N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin enthält, und als Negativkontrolle einem Röhrchen 100 µl Waschlösung hinzugefügt. Den übrigen Testansätzen wurde je nach Versuchsaufbau 100 µl Allergen alleine (Endkonzentration: 0,001 ng/ml, 0,0045 ng/ml, 0,0454 ng/ml, 0,4545 ng/ml, 4,5454 ng/ml, 45,454 ng/ml 454,54 ng/ml oder 4545,4 ng/ml) oder in Kombination mit AERex<sup>1d</sup> in Endkonzentrationen von 0,0096 m<sup>3</sup>, 0,0128 m<sup>3</sup>, 0,0148

m<sup>3</sup>, 0,0192 m<sup>3</sup> oder 0,0275 m<sup>3</sup> Luftäquivalent oder AERex<sup>5d</sup> in Endkonzentrationen von 0,037 m<sup>3</sup>, 0,053 m<sup>3</sup>, 0,062 m<sup>3</sup>, 0,075 m<sup>3</sup>, 0, 094 m<sup>3</sup>, 0,151 m<sup>3</sup> oder 0,755 m<sup>3</sup> hinzugefügt.

Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 37°C im Wasserbad. Der Aktivierungsprozess wurde durch fünfminütige Inkubation der Proben auf Eis abgestoppt. Anschließend erfolgte die Färbung während einer 20 min dauernden Inkubation im abgedunkelten Eisbad mit 20 µl eines zweifarbigen Antikörperreagenz. Dies enthielt zwei verschiedene monoklonale Antikörper, die mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert waren. Der monoklonale Antikörper anti-IgE-PE, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin konjugiert, bindet an humanes Immunglobulin E und erkennt daher basophile Granulozyten. Der monoklonale Antikörper anti-gp53-FITC ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein konjugiert und erkennt ein auf aktivierten Basophilen exprimiertes Glykoprotein gp53 (entspricht CD63). Alle weiteren Schritte erfolgten unter Abdeckung der Proben als Lichtschutz. Anschließend wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml Lyse Lösung bei Raumtemperatur 10 min lysiert. Die Proben wurden bei 4°C für 5 min mit 1100 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Je Probe wurden 3 ml Waschlösung zugegeben und kurz gemischt. Es erfolgte eine abermalige Zentrifugation bei 4°C über 5 min mit 1100 rpm und anschließender Entfernung des Überstandes.

Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen in 200 µl Waschlösung resuspendiert, kurz gemischt und der Prozentsatz an aktivierten basophilen Granulozyten innerhalb von zwei Stunden durchflußzytometrisch bestimmt.

#### 3.5.2 Messung und Auswertung am Durchflußzytometer

Die Zellen wurden im Durchflußzytometer bei blaugrüner Lichtanregung analysiert (488nm Argonlaser). Während der Datenaufnahme mit CellQuest<sup>TM</sup> Software (Becton Dickinson, San Jose, USA) wurde durch das Setzen eines entsprechenden Schwellenwertes im FL2-Kanal ein Gate auf basophile Granulozyten mit hoher IgE-Expression, messbar durch die Anwesenheit von anti-IgE-PE, gesetzt. Pro Probe wurden wenigstens 1000 Basophile akquiriert. Ausgewertet wurde der Prozentsatz an aktivierten Basophilen. Hierzu wurden durch das Setzen eines Auswertefensters im Dot Plot Diagramm linSSC/logFL2 Zellen mit starker IgE-Expression eingegrenzt.

Es wurde der Prozentsatz an Basophilen bestimmt, die das Aktivierungsantigen gp53 exprimierten. Dazu wurden im FL1-Histogramm des Kontrollansatzes Marker gesetzt. Unter Beibehaltung dieser Markerpositionen wurde dann der Prozentsatz an positiven Zellen bestimmt (siehe Abb.3). Laut der Anweisung des Herstellers wurden Ergebnisse mit mehr als 15 % aktivierten basophilen Granulozyten als positiv gewertet. Alle Untersuchungen fanden außerhalb der Birkenpollenflugsaison statt, die in München vom 10.04. bis 01.05.2003 dauerte.

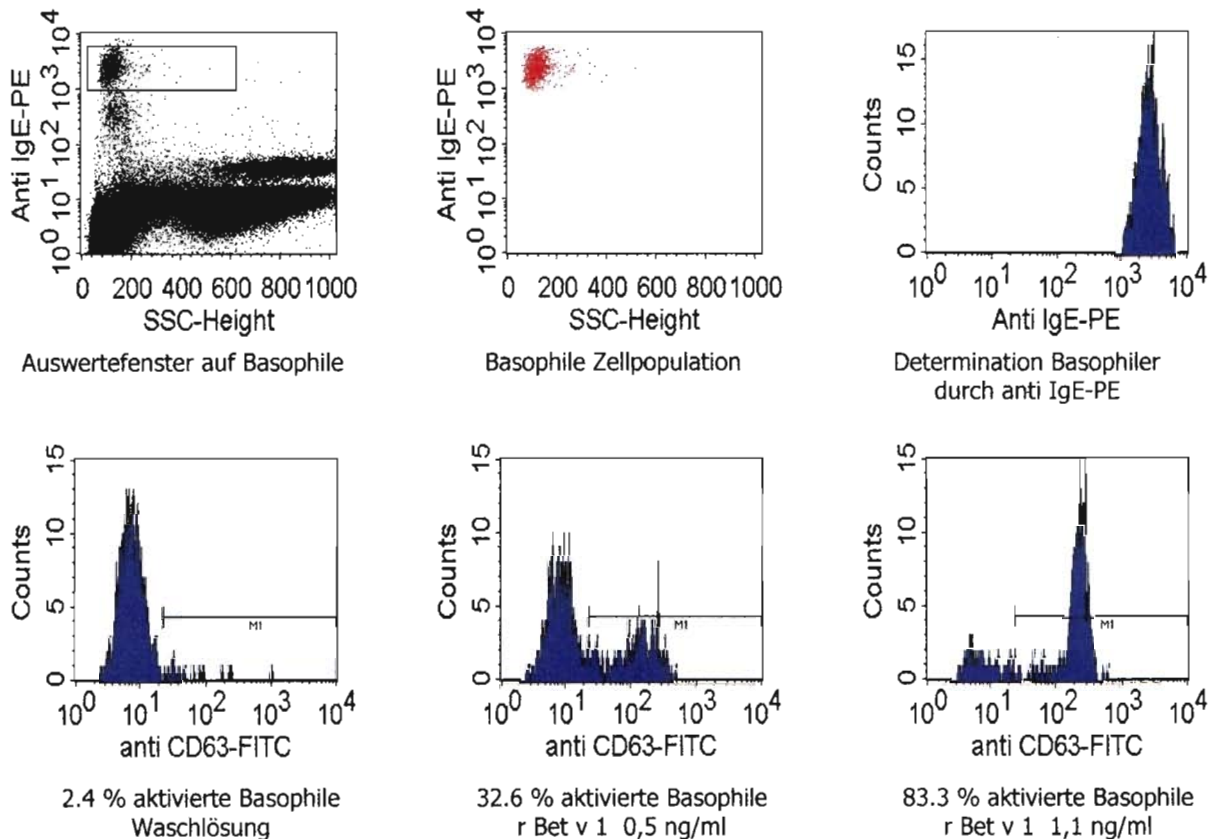


Abb.4: Facs-Analyse der basophilen Granulozyten nach Durchführung des Basotest<sup>®</sup> mittels Blut eines Birkenpollenallergikers.

### 3.5.3 Versuchsaufbau

In Vorversuchen wurden zunächst die basophilen Granulozyten jedes Patienten auf die Aktivierungsfähigkeit durch rBet v 1 getestet. Es wurde hierzu eine rBet v 1-Titration durchgeführt. Neben der Positiv- und Negativkontrolle wurde den übrigen Teströhrchen rBet v 1 in abfallenden Konzentrationen von final 450 ng/ml bis 0,0045 ng/ml hinzugefügt. Diese Testreihe wurde mit dem Blut jedes Patienten durchgeführt,

um die jeweils individuelle Ansprechbarkeit auf rBet v 1 zu untersuchen und somit die optimale rBet v 1-Konzentration zu ermitteln.

Ziel war es, einen Aktivierungsgrad der basophilen Granulozyten zu erreichen, der einerseits eindeutig positiv war, von dem aus andererseits ein weiterer Zuwachs der Aktivierung noch deutlich zu erkennen war. Als geeignete Allergenkonzentration galt diejenige rBet v 1-Konzentration, bei der die basophilen Granulozyten des jeweiligen Patienten zwischen 15 % und 50 % aktiviert wurden. Mit dieser Allergenkonzentration wurden die weiteren Versuche durchgeführt.

Bei den folgenden Experimenten bestand der Versuchsaufbau jeweils aus Positiv- und Negativkontrolle, sowie einem Testansatz mit der zuvor ermittelten rBet v 1-Konzentration. Weiteren Teströhrchen wurde 10 µl Allergen derselben Endkonzentration, aber zusätzlich auch 10 µl AERex<sup>1d</sup>, bzw. AERex<sup>5d</sup>, in aufsteigenden Endkonzentrationen von 0,0096 bis 0,7551 m<sup>3</sup> Luftäquivalent hinzugefügt, unter Beibehaltung des Gesamt-Zusatzvolumens von 100 µl pro Testansatz durch Hinzufügen von 80 µl Waschpuffer.

Da AERex in DMSO aufgenommen wurde, wurde als Kontrolle dem Blut rBet v 1 und zusätzlich DMSO in Endkonzentrationen von 0,002 bis 0,045 % entsprechend des DMSO Gehaltes in den zuvor eingesetzten AERex-Proben zugefügt. Als abschließende Kontrollen wurde einer weiteren Testreihe jeweils nur AERex oder nur DMSO in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt.

Für die Kontrollversuche mit dem Blut der nichtallergischen Patienten wurde die höchste rBet v 1 Konzentration der vorausgehenden Versuche eingesetzt: 2,3 ng/ml. Ebenso wurden dieselben AERex Konzentrationen, die in den vorausgehenden Versuchen bei dem allergischen Patientenkollektiv den verstärkenden Effekt gezeigt hatten, sowie die dazugehörigen DMSO-Kontrollen eingesetzt.

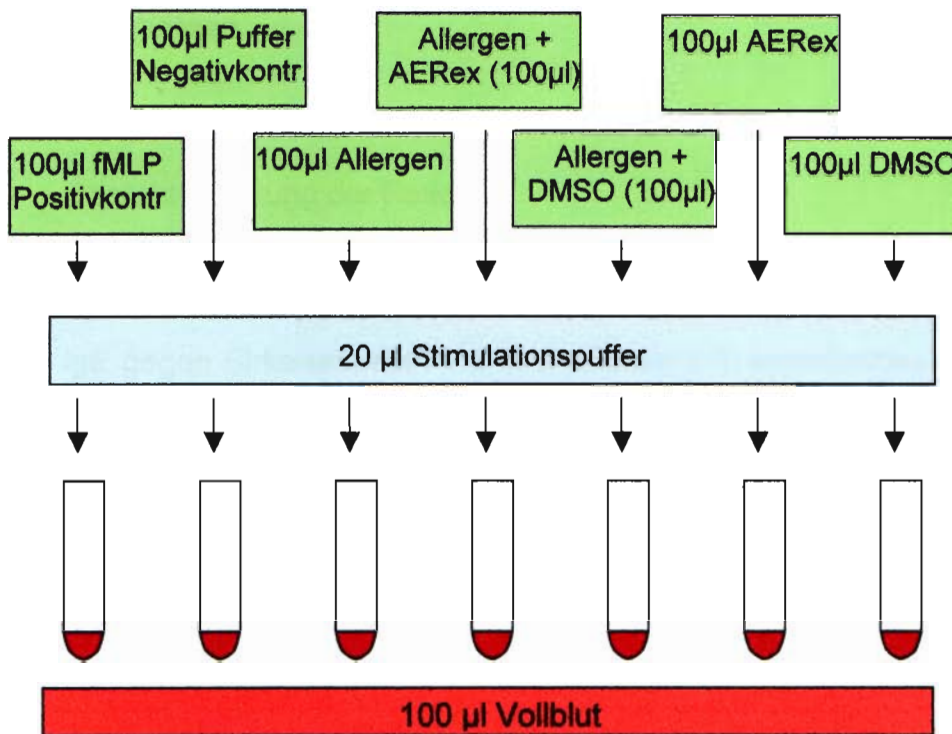


Abb.5: Versuchsaufbau Basophilen-Aktivierungstest

### 3.6 Statistische Analyse

Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein gepaarter T-Test wurde angewendet, um die Unterschiede der CD63 Expression der basophilen Granulozyten zwischen AERex und Kontrollen zu ermitteln. Ein  $p$  Wert von  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Patienten

Alle Patienten wiesen einen deutlich positiven Pricktest auf Birke auf (++++), sowie spezifisches IgE gegen Birke und rBet v 1 CAP-Klasse  $\geq 3$ , spezifisches IgE  $\geq 3,50$  kU/l, (UniCAP<sup>®</sup>, Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Deutschland).

Das Kontrollkollektiv wurde durch negativen Pricktest, Gesamt IgE von  $< 25$  kU/l und niedrigem spezifischen Serum IgE (CAP-Klasse 0, spezifisches IgE  $\leq 0,34$  kU/l) gegen Birke und Bet v 1 charakterisiert.

Probanden	Geschlecht	Alter	Prick Test	RAST Klasse	RAST Klasse
			Birke	Birke*	r Bet v 1
Patienten					
I	f	26	++++	4	3
II	m	24	++++	3	3
III	f	21	++++	4	4
IV	f	39	++++	4	4
V	m	38	++++	3	3
VI	f	23	++++	3	3
Kontrollen					
I	f	24	neg.	0	0
II	m	32	neg.	0	0
III	f	26	neg.	0	0
IV	m	31	neg.	0	0
V	f	23	neg.	0	0

Tab.3: Charakterisierung der Birkenpollenallergiker und der gesunden Kontrollpersonen: Alter, Geschlecht, spezifische IgE-Konzentrationen (CAP-RAST Klasse 0-6), Ergebnis des Haut Prick Test, \*t3, Pharmacia UniCap<sup>®</sup>

## 4.2 Charakterisierung von AERex

Sämtliche Herstellungsschritte der Umweltextrakte sowie die analytischen Untersuchungen erfolgten am Institut für Ökologische Chemie des GSF-Forschungszentrums für Gesundheit und Umwelt in Neuherberg, München unter der Leitung von Patrick Bohn sowie der Mitarbeit von Yücel Saritas, Jutta Lintelmann und Georg Matuschek.

### 4.2.1 Qualitative Charakterisierung von AERex

In der GC-MS Analyse von AERex<sup>1d</sup> und AERex<sup>5d</sup> wurden mindestens neun organische Komponentenklassen identifiziert. Besonders aromatische Verbindungen wie PAK und ihre Derivate konnten nachgewiesen werden.

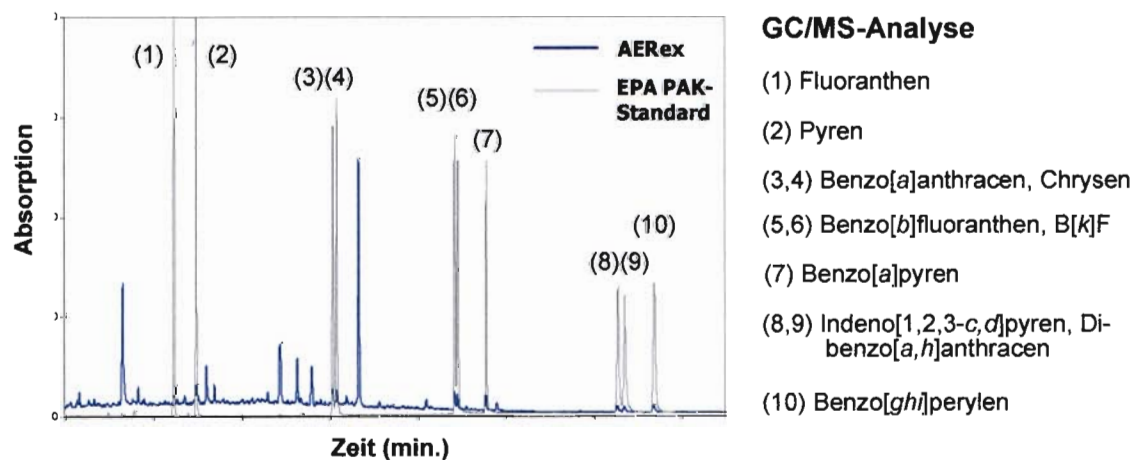


Abb.6: Qualitative Charakterisierung von AERex durch GC-MS Analyse

## Organische Komponenten:

- PAK
- PAK-Ketone und PAK-Quinone
- Nitro-PAK
- n-Alkane
- aliphatische Säuren
- substituierte Phenole
- Guaiacole
- substituierte Guaiacole
- Dicarboxylsäuren
- aromatische Carboxylsäuren

Tab.4: Charakterisierung von AERex durch GC-MS Analyse

## 4.2.2 Quantitative Charakterisierung von AERex

Die Massenkonzentration der Summe aller untersuchter PAK war in AERex<sup>1d</sup> (1,14 ng/m<sup>3</sup>) ungefähr 20fach höher als in AERex<sup>5d</sup> (0,06 ng/m<sup>3</sup>). Diese Werte sind vergleichbar mit Werten von atmosphärischen Schwebstäuben die bei vorangegangenen Studien in München gesammelt wurden [31, 49, 50]. Abhängig vom jeweiligen PAK konnten 10 bis 1500-fach höhere Konzentrationen in AERex<sup>1d</sup> als in AERex<sup>5d</sup> gemessen werden. So betrug der B[a]P Gehalt in AERex<sup>1d</sup> 165 ng/ml, während in AERex<sup>5d</sup> nur 0,20 ng/ml detektiert wurden. Andere, von der EPA als wichtige Umweltschadstoffe eingestufte PAK, waren ebenfalls nur marginal in AERex<sup>5d</sup> zu messen.



PAK EPA Prioritätsliste*	AERex <sup>1d</sup> [ng/ml Extrakt] <sup>a</sup>	AERex <sup>5d</sup> [ng/ml Extrakt] <sup>b</sup>
Acenaphthen*	n.d.	n.d.
Anthanthren	17,00	0,22
Anthracen*	51,15	5,34
Benzo[a]anthracen*	256,38	2,30
Benzo[b]fluoranthen*	513,02	0,35
Benzo[k]fluoranthen*	201,69	0,26
Benzo[g,h,i]perylen*	76,05	0,69
Benzo[a]pyren*	164,70	0,20
Benzo[e]pyren	808,01	0,98
Chrysen*	546,32	3,88
Coronen	n.d.	0,26
Dibenzo[a,h]anthracen	12,35	0,19
Fluoranthen*	945,04	96,35
Fluoren*	n.d.	4,40
Indeno[1,2,3-c,d]pyren*	92,46	n.d.
Naphthalen*	n.d.	9,21
Phenanthren	391,89	62,58
Pyren	730,62	66,39
<b>PAK- Gesamtgehalt [ng/m<sup>3</sup>]</b>	<b>1,14</b>	<b>0,06</b>

Tab.5: HPLC Analyse von AERex; Lösungsmittel: DMSO; n.d.: nicht detektiert;  
<sup>a</sup>4233,33 m<sup>3</sup> Luft/ml; <sup>b</sup>4152,73 m<sup>3</sup> Luft/ml;

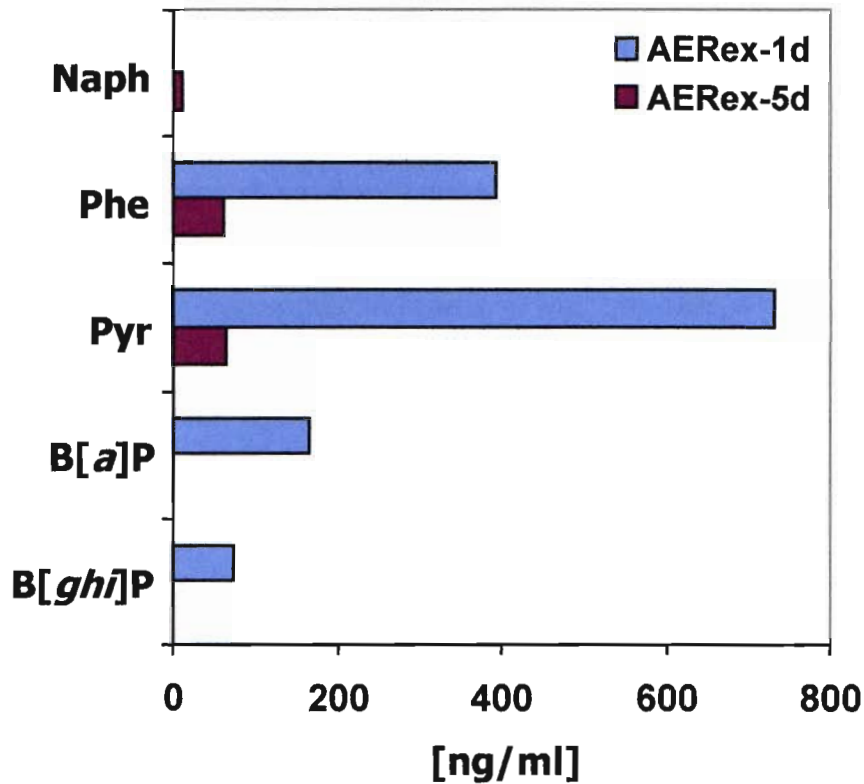


Abb.7: Konzentrationen ausgewählter PAK: Naphthalin, Phenanthren, Pyren, Benzo[a]pyren, Benzo[ghi]perylen

#### 4.2.3 LPS Reaktivität in AERex

Bei der Messung in 1:100 Verdünnung konnte keinerlei LPS Reaktivität in beiden Filterextrakten festgestellt werden. Die im Basophilen Aktivierungstest verwendeten AERex Konzentrationen lagen somit unter der Nachweisgrenze des LAL-Test (0,05 E.U./ml).

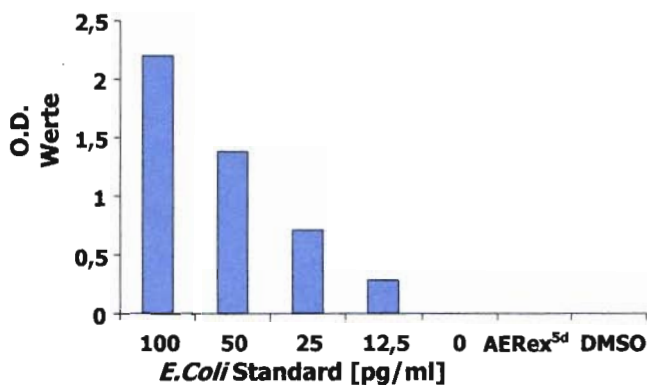


Abb.8: LPS-Gehalt in AERex am Beispiel von AERex<sup>5d</sup>

## 4.3 rBet v 1-induzierte CD63 Expression auf basophilen Granulozyten

Zunächst wurden Blutproben jedes allergischen Spenders mit Verdünnungsreihen von rBet v 1 inkubiert, um die Antigen-induzierte Regulation der CD63 Expression auf basophilen Granulozyten in Abhängigkeit von der Allergenkonzentration zu analysieren. Die Basophilenaktivierung war bei allen Patienten dosisabhängig und erreichte ihr Maximum bei einer Stimulation mit 4,5 ng/ml rBet v 1. Ziel war es, eine Aktivierung der basophilen Granulozyten durch rBet v 1 im dynamischen Bereich zwischen 15 % und 50 % zu erreichen, um einen modulatorischen Effekt von AERex im weiteren Verlauf untersuchen und vergleichen zu können. Die optimale rBet v 1-Konzentration variierte daher je nach Patient (siehe Abb.9). Die in den Folgeversuchen eingesetzte Konzentration an rBet v 1 bewegte sich je nach Patient zwischen 0,05 und 2,3 ng/ml. Die Schwankungsbreite der CD63 Expression nach Stimulation mit rBet v 1 innerhalb eines Versuches betrug weniger als  $\pm 1,5$  %. Die basophilen Granulozyten der gesunden Probanden zeigten keine Hochregulation der CD63 Expression durch rBet v 1 (Aktivierung der Basophilen Granulozyten bei Inkubation mit 2,3 ng/ml rBet v 1 betrug 3,58 %, Mittelwert aus  $n=5$ , siehe Tab.15).

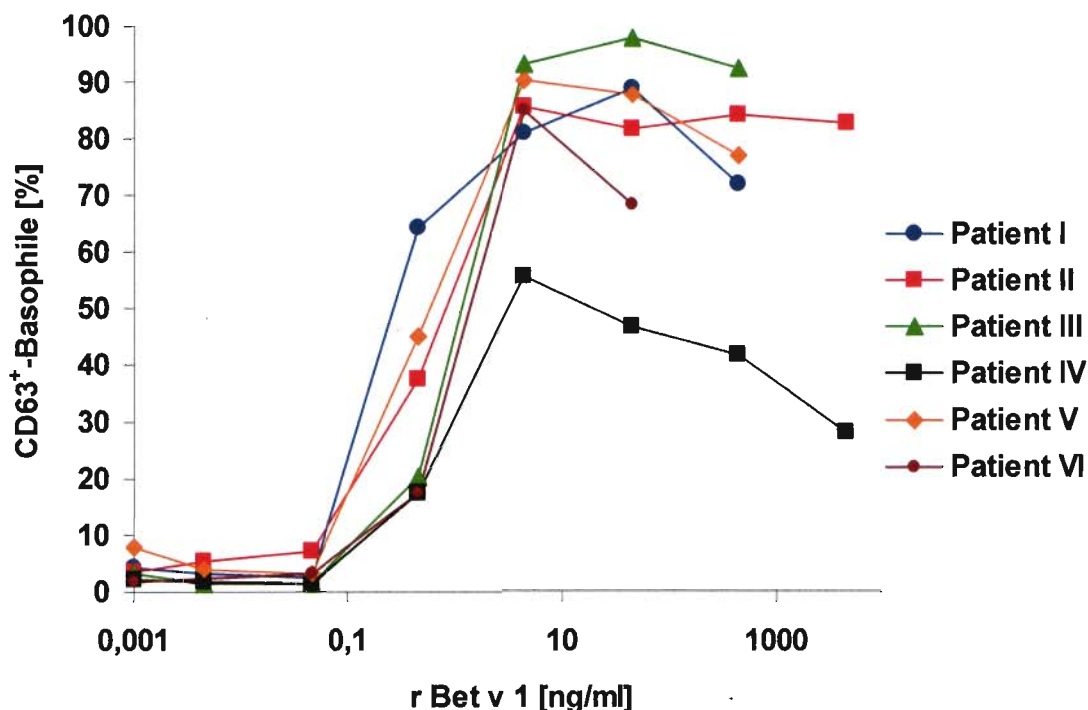


Abb.9: Titration des rBet v 1, Suche nach der optimalen Allergenkonzentration für den angestrebten Aktivierungsbereich der basophilen Granulozyten;

#### 4.4 Effekte von AERex auf die Basophilenaktivierung allergischer Probanden

Der Effekt von AERex auf basophile Granulozyten trat dosisabhängig auf. Für jeden Patienten wurde ein schmales Wirkungsfenster ermittelt, in welchem sich die Aktivität der basophilen Granulozyten, im Vergleich zum Kontrollansatz mit ausschließlich rBet v 1, signifikant steigerte, wenn man zusätzlich AERex hinzufügte.

##### *AERex<sup>1d</sup>*

Basophile Granulozyten von Patient I zeigten bei Inkubation mit rBet v 1 0,25 ng/ml eine Aktivierung von 18,16 % (Mittelwert, n=2). Bei Koinkubation mit AERex<sup>1d</sup> 0,019 m<sup>3</sup> zeigte sich eine Steigerung der Aktivität auf 27,85 % (Mittelwert, n=2), bei 0,014 m<sup>3</sup> eine Steigerung auf 51,08 % (Einzelwert, siehe Tab.7, Abb.10).

Basophile von Patient II zeigten bei Inkubation mit rBet v 1 0,5 ng/ml eine Aktivierung von 15,98 % (Mittelwert, n=3), bei Koinkubation mit AERex<sup>1d</sup> 0,019 m<sup>3</sup> eine Steigerung auf 37,26 % (Mittelwert, n=3; siehe Tab.8, Abb.11).

Basophile von Patient III zeigten bei Inkubation mit rBet v 1 0,05–2,3 ng/ml (n=3 Versuche mit unterschiedlichen rBet v 1 Konzentrationen: 0,05 ng/ml, 0,5 ng/ml, 2,3 ng/ml) eine Aktivierung von 60,49 % (Mittelwert, n=3), bei Koinkubation mit AERex<sup>1d</sup> 0,019 m<sup>3</sup> eine Steigerung auf 86,07 % (Mittelwert, n=3; siehe Tab.9, Abb.12).

##### *AERex<sup>5d</sup>*

Bei Inkubation mit rBet v 1 0,23 - 0,5 ng/ml (3 Versuche mit unterschiedlichen rBet v 1 Konzentrationen: 0,23 ng/ml, 0,5 ng/ml) zeigten Basophile von Patient II in einem erneuten Versuchsansatz eine Aktivierung von 11,12 % (Mittelwert, n=3), bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,125 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 13,62 % (Mittelwert, n=3), bei AERex<sup>5d</sup> 0,094 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 15,47 % (Mittelwert, n=2), bei AERex<sup>5d</sup> 0,075 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 17,26 % (Mittelwert, n=3), bei AERex<sup>5d</sup> 0,062 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 14,07% (Mittelwert, n=2), bei AERex<sup>5d</sup> 0,053 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 13,65 % (Mittelwert, n=3) und bei Inkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,037 m<sup>3</sup> einen Abfall der Aktivierung auf das Ausgangsniveau von 10,49 % (Mittelwert, n=3; siehe Tab.10, Abb.13, Abb.18).

Basophile von Patient III zeigten in einem erneuten Versuchsansatz bei Inkubation mit rBet v 1 0,1 ng/ml eine Aktivierung von 48,38 %, die sich bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,755 m<sup>3</sup> auf 62,24 % steigerte und bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,377 m<sup>3</sup>

wieder auf das Ausgangsniveau von 48,54 % abfiel (siehe Tab.11, Abb.14). Es handelte sich um einen Versuchsansatz.

Basophile von Patient IV zeigten bei Inkubation mit rBet v 1 2,3 ng/ml eine Aktivierung von 27,59 %, bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,125 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 32,38 % bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,094 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 45,25 %, die bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,075 m<sup>3</sup> auf Ausgangsniveau von 25,94 % abfiel (n=1; siehe Tab.12, Abb.15).

Bei Inkubation mit rBet v 1 2,3 ng/ml zeigten Basophile von Patient V eine Aktivierung von 37,84 % (Mittelwert, n=2), bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,062 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 43,06 % (Mittelwert, n=2) die bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,053 m<sup>3</sup> auf 37,76 % abfiel (Mittelwert, n=2; siehe Tab.13, Abb.16).

Bei Inkubation mit rBet v 1 0,2 ng/ml zeigten Basophile von Patient VI eine Aktivierung von 36,85 %, bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,151 m<sup>3</sup> eine Aktivierung von 51,91 %, die bei Koinkubation mit AERex<sup>5d</sup> 0,125 m<sup>3</sup> auf 34,94 % abfiel (n=1; siehe Tab.14, Abb.17).

Beide organischen Extrakte zeigten synergistische Effekte bei Koinkubation mit rBet v 1 und induzierten eine signifikante Steigerung der Aktivität von basophilen Granulozyten allergischer Probanden im Vergleich zu einer Inkubation mit rBet v 1 alleine. Eine Inkubation mit ausschließlich AERex<sup>1d</sup> oder AERex<sup>5d</sup> zeigte keinerlei Effekte auf die CD63 Expression der basophilen Granulozyten. Es zeigte sich eine Aktivierung zwischen 1 und 9 %, entsprechend der Mediumkontrolle (siehe Tab. 7-13). Dies spricht für das Fehlen eines direkten Effektes von AERex auf humane Basophile in unserer Studie.

Eine Koinkubation mit DMSO und rBet v 1 ergab keine Änderung der Aktivität im Vergleich zu einer Inkubation mit ausschließlich rBet v 1 (siehe Tab. 7-14). Inkubationen mit ausschließlich DMSO zeigten keinerlei Auswirkungen auf die Basophilenaktivierung. Es zeigte sich eine Aktivierung zwischen 1 und 4 %, vergleichbar zur Mediumkontrolle (siehe Tab. 7-14).

Es wurden keine zytotoxischen Effekte von AERex bei Verdünnungen von 1:1000 und höher (< 0,1 % DMSO) beobachtet. Die Verteilung der Zellen bei Messung im Durchflußzytometer blieb regelrecht entsprechend der Anweisungen des Herstellers. Aktivierung mit 0,05 – 2,3 ng/ml rBet v 1 induzierte eine CD63 Hochregulation der basophilen Granulozyten auf bis zu 50 %. Nach Inkubation mit AERex und Allergen steigerte sich die Basophilenaktivierung aller Patienten auf bis zu 90 % (siehe

Abb.19). Dieser Effekt war mit AERex<sup>1d</sup> größer als mit AERex<sup>5d</sup> (siehe Abb.20). Im Vergleich zu AERex<sup>1d</sup> wurden von AERex<sup>5d</sup> 5 bis 50-fach höhere Konzentrationen benötigt, um einen maximalen Effekt auf die Basophilenaktivierung auszulösen. So wurden von AERex<sup>1d</sup> 0,014 – 0,019 m<sup>3</sup> Luftäquivalente eingesetzt während von AERex<sup>5d</sup> 0,075 – 0,755 m<sup>3</sup> Luftäquivalente benötigt wurden um maximale Effekte zu beobachten. Dies korreliert mit der ca 20-fach höheren PAK- Konzentration der Eintagessammlung.

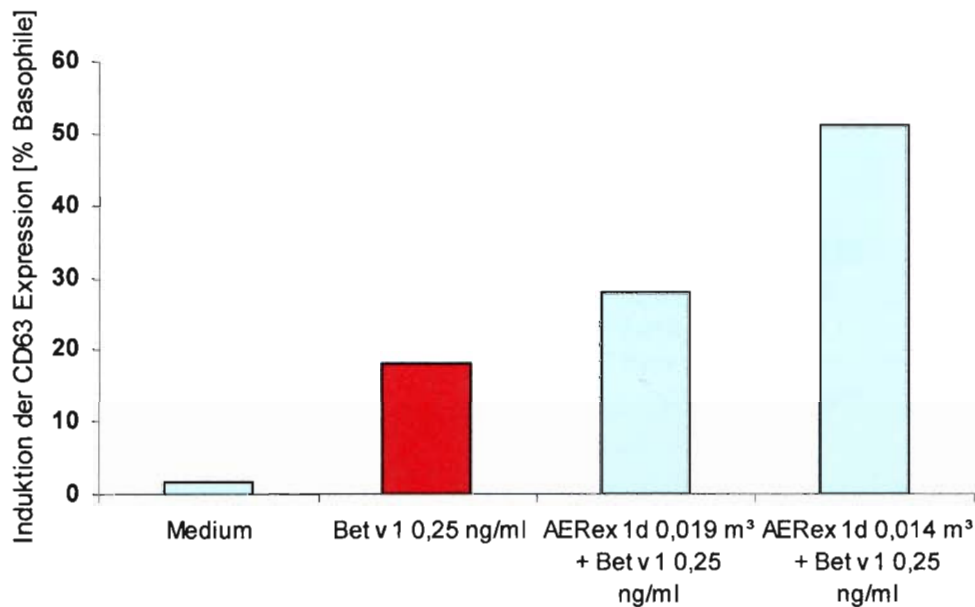


Abb.10: Basophilenaktivierung von Patient I bei Inkubation mit rBet v 1 0,25 ng/ml und AERex<sup>1d</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte (n=2 bzw. n=1).

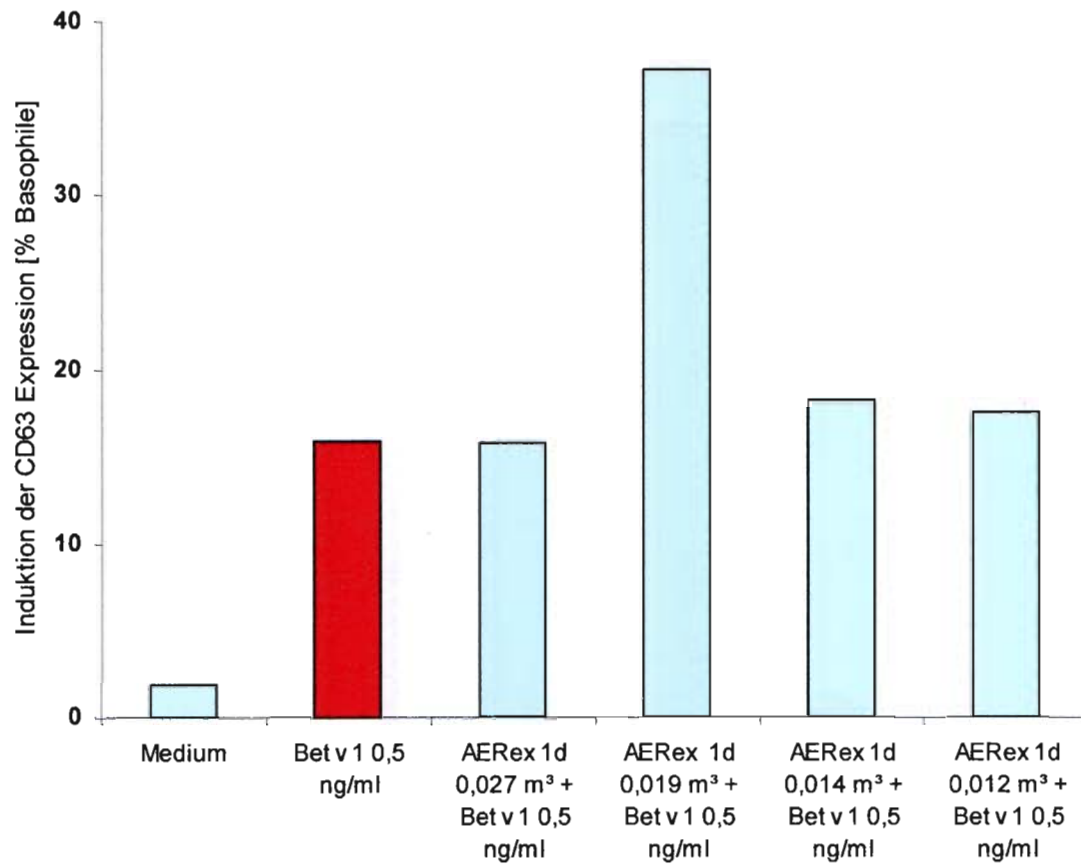


Abb.11: Basophilenaktivierung von Patient II bei Inkubation mit rBet v 1 0,5 ng/ml und AERex<sup>1d</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3).

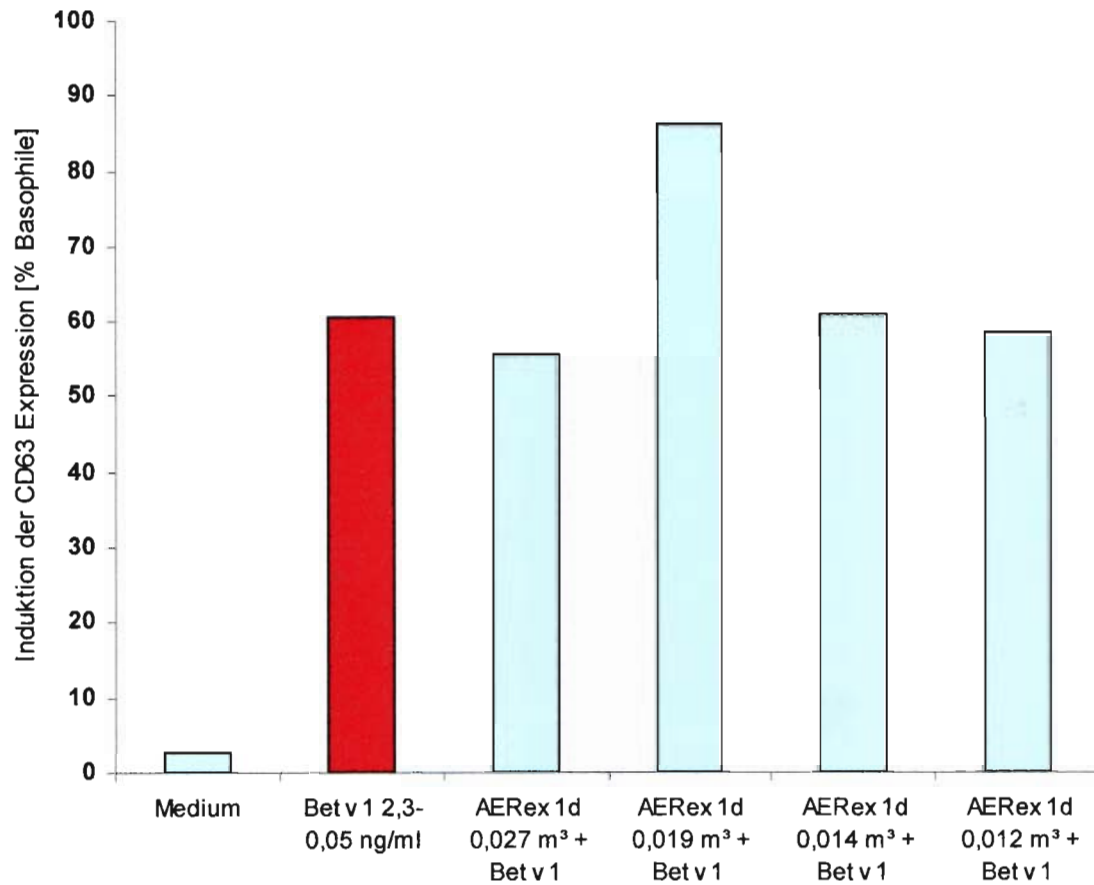


Abb.12: Basophilenaktivierung von Patient III bei Inkubation mit rBet v 1 0,05 – 2,3 ng/ml und AERex<sup>1d</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3).



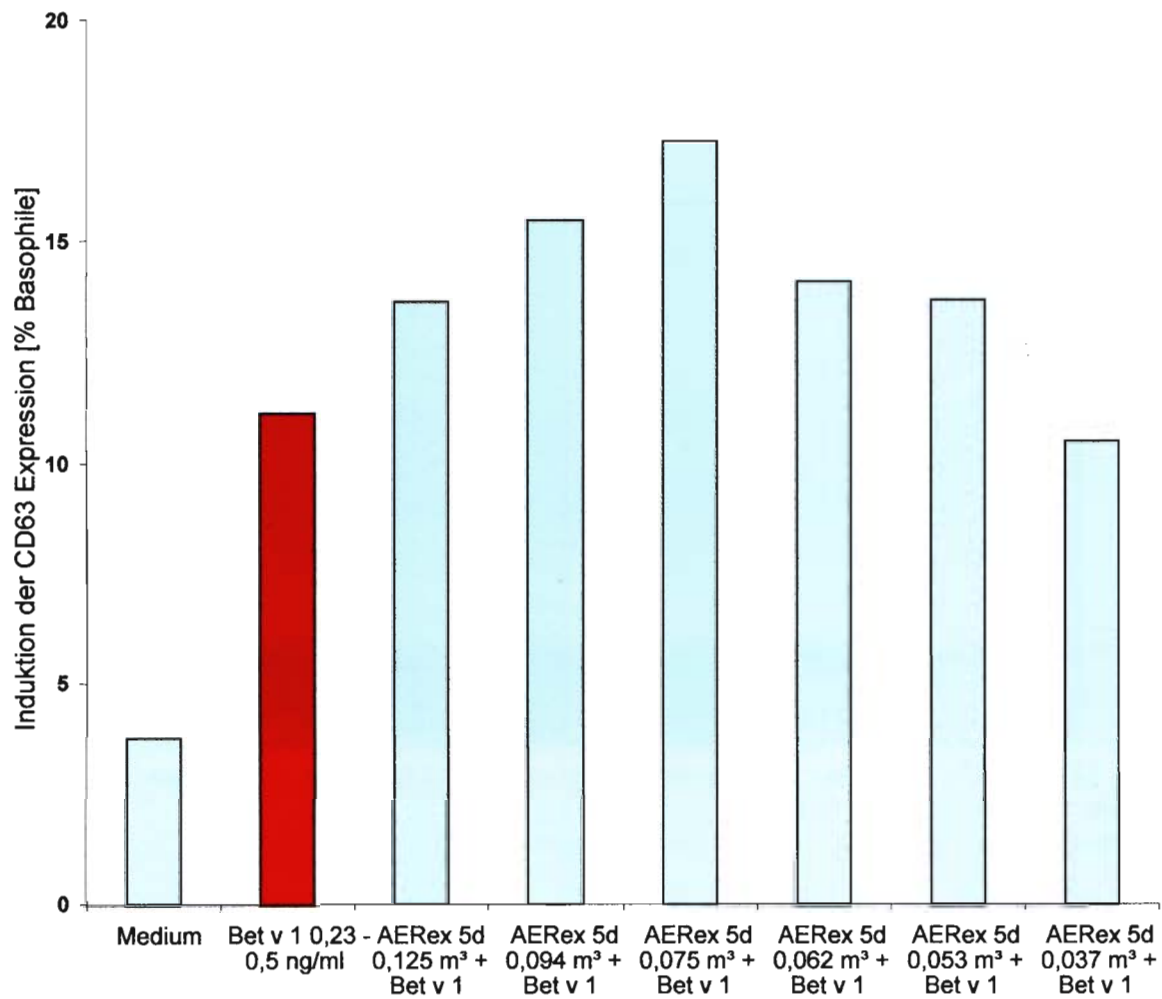


Abb. 13: Basophilenaktivierung von Patient II bei Inkubation mit rBet v 1 0,23 – 0,5 ng/ml und AERex<sup>5d</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte (n=3).

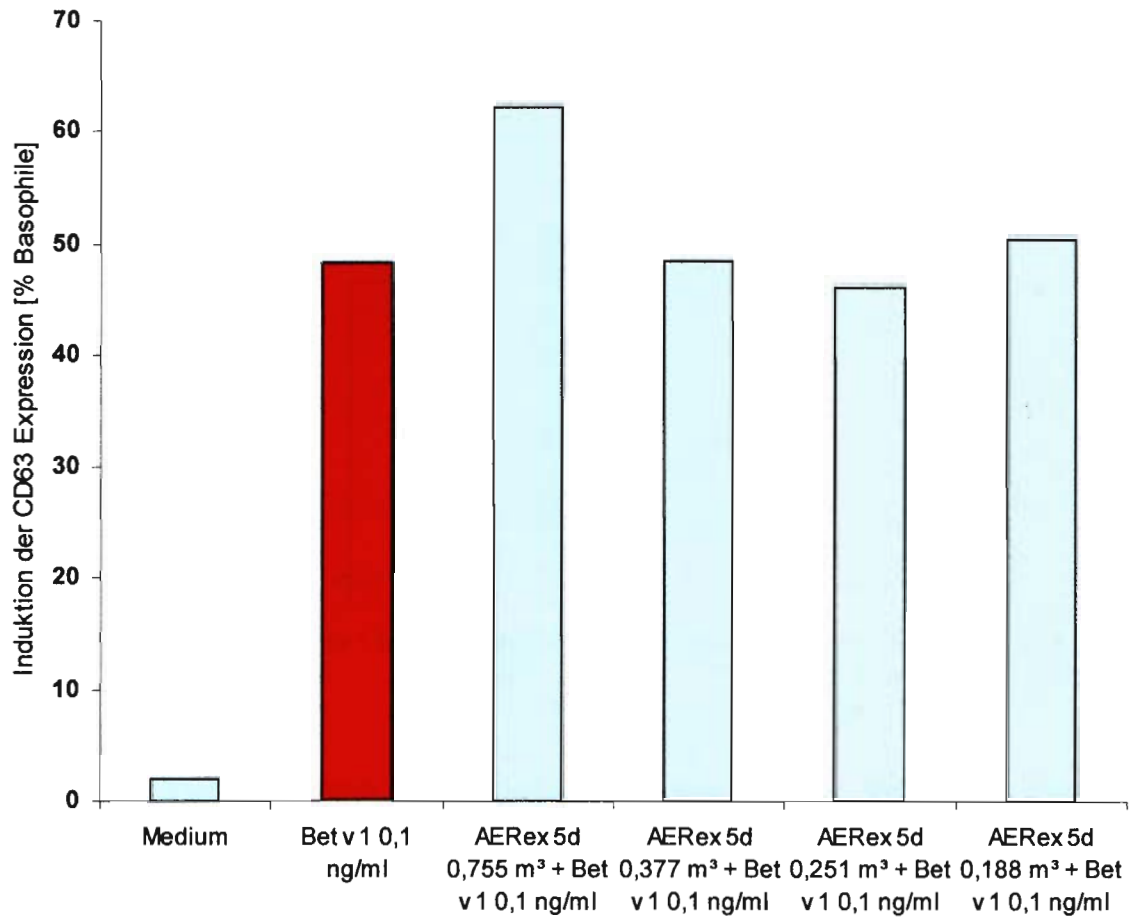


Abb.14: Basophilenaktivierung von Patient III bei Inkubation mit rBet v 1 0,1 ng/ml und AERex<sup>5d</sup>. Dargestellt sind Daten aus einem Versuchsansatz.

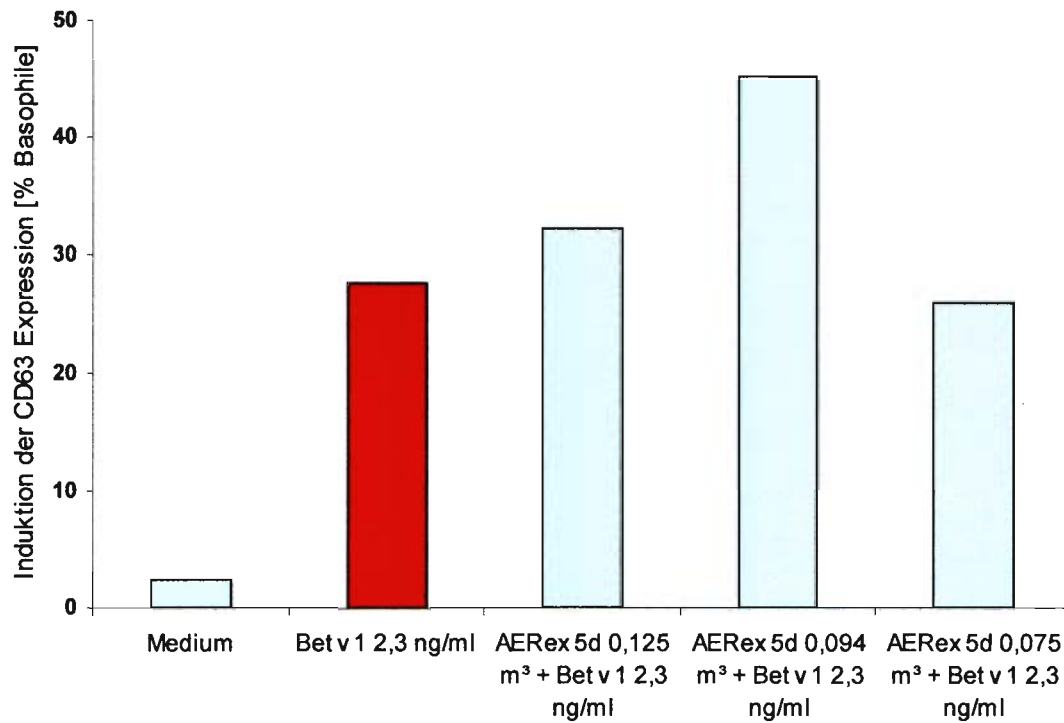


Abb.15: Basophilenaktivierung von Patient IV bei Inkubation mit rBet v 1 2,3 ng/ml und AERex<sup>5d</sup>. Dargestellt sind Daten aus einem Versuchsansatz.

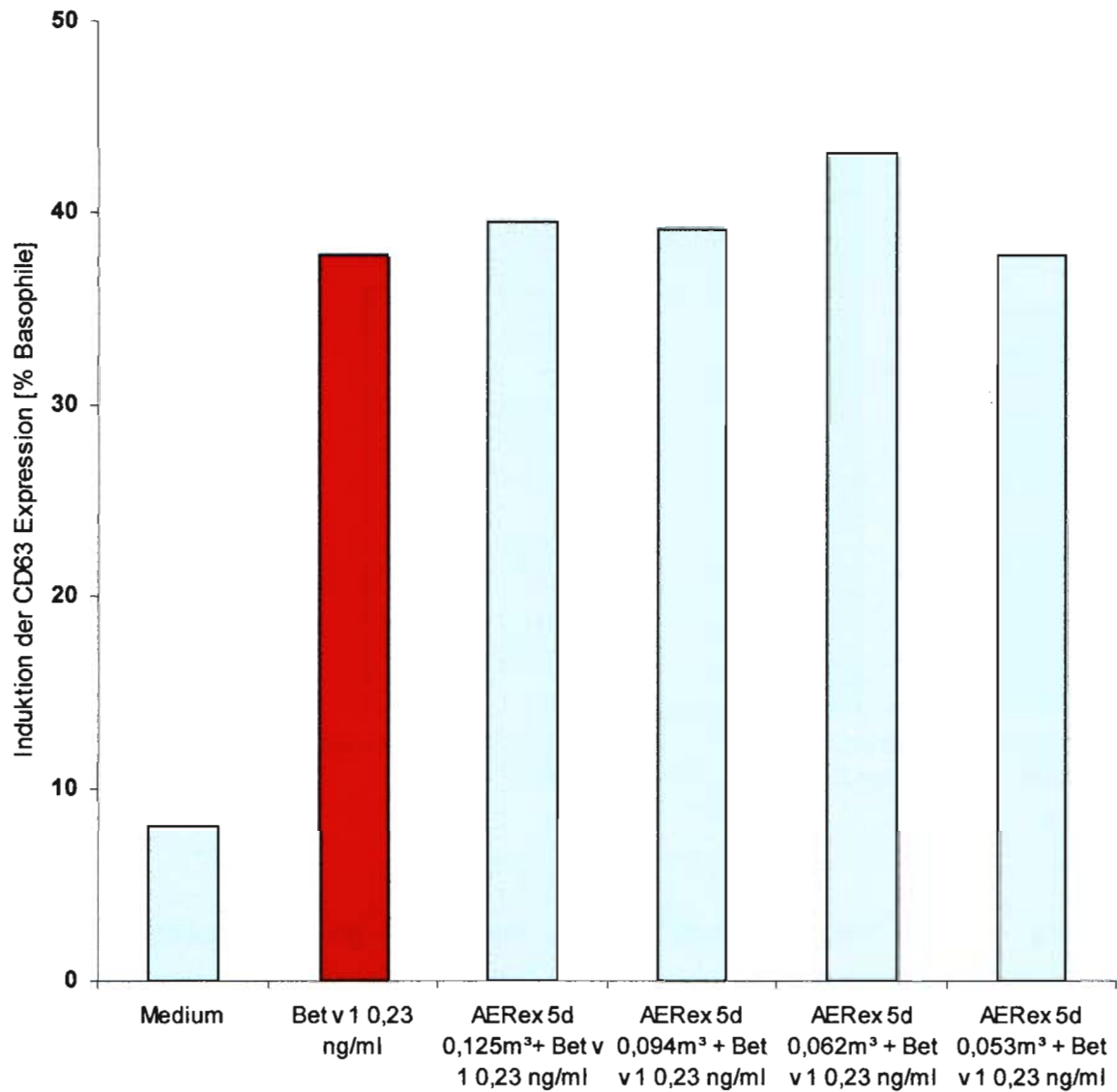


Abb.16: Basophilenaktivierung von Patient V unter Inkubation mit rBet v 1 0,23 ng/ml und AERex<sup>5d</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte (n=2).

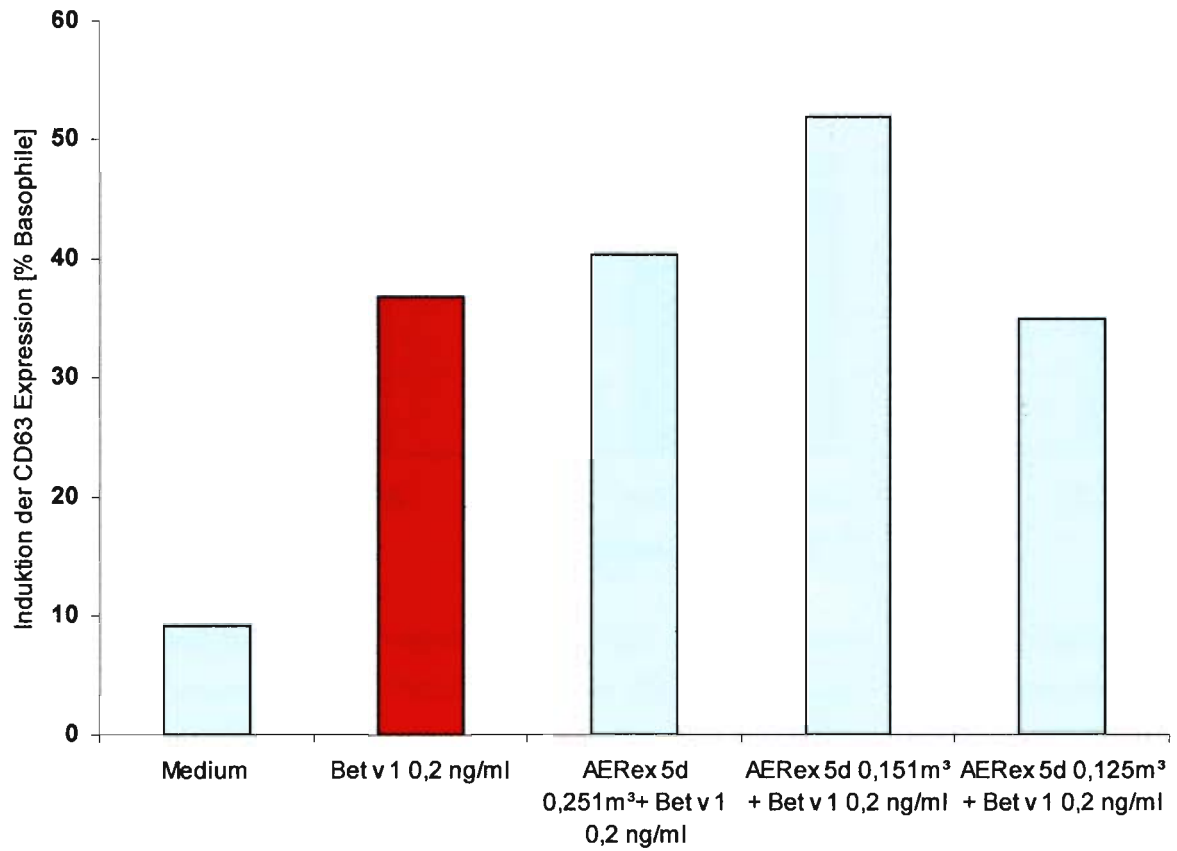


Abb.17: Basophilenaktivierung von Patient VI bei Inkubation mit rBet v 1 0,2 ng/ml und AERex<sup>5d</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte (n=2).

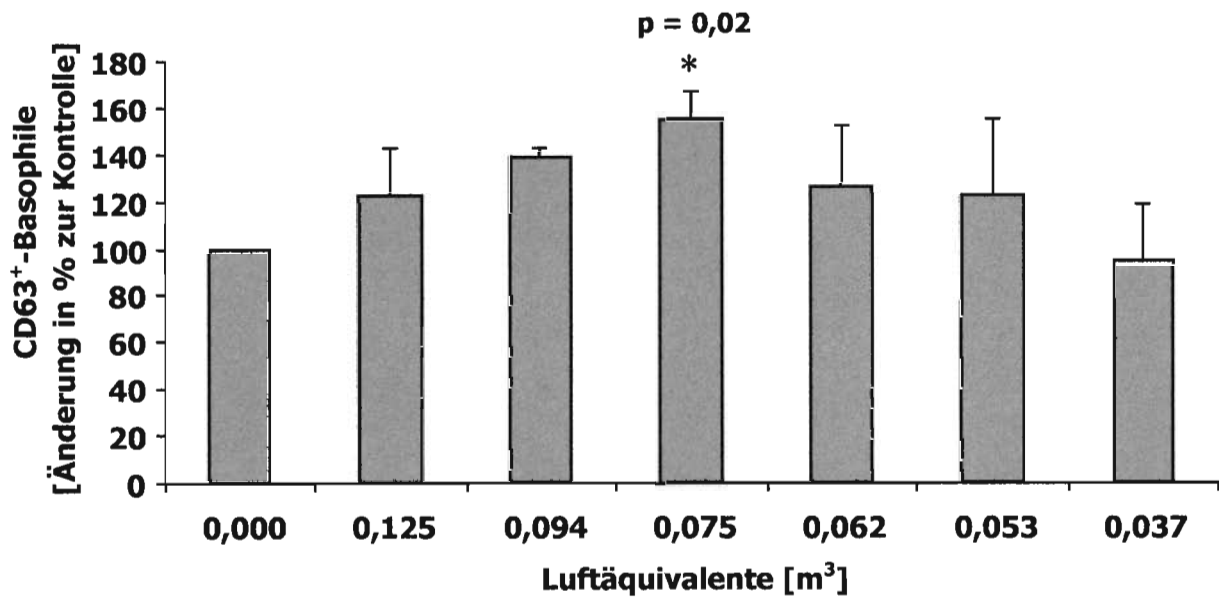


Abb.18: Dosisabhängige Hochregulation von rBet v 1-induzierter Basophilen-aktivierung durch AERex<sup>5d</sup>. Basophile von Patient II wurden mit 0,3 ng/ml rBet v 1 und verschiedenen Konzentrationen von AERex<sup>5d</sup> (0,755 – 0,007 m<sup>3</sup>) inkubiert, um die Dosis-Wirkungs-Beziehung von AERex auf die rBet v 1-induzierte Basophilenaktivierung zu verdeutlichen. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse werden in Prozent der maximalen CD63 Expression (100%) nach Stimulation mit 0,3 ng/ml rBet v 1 angegeben

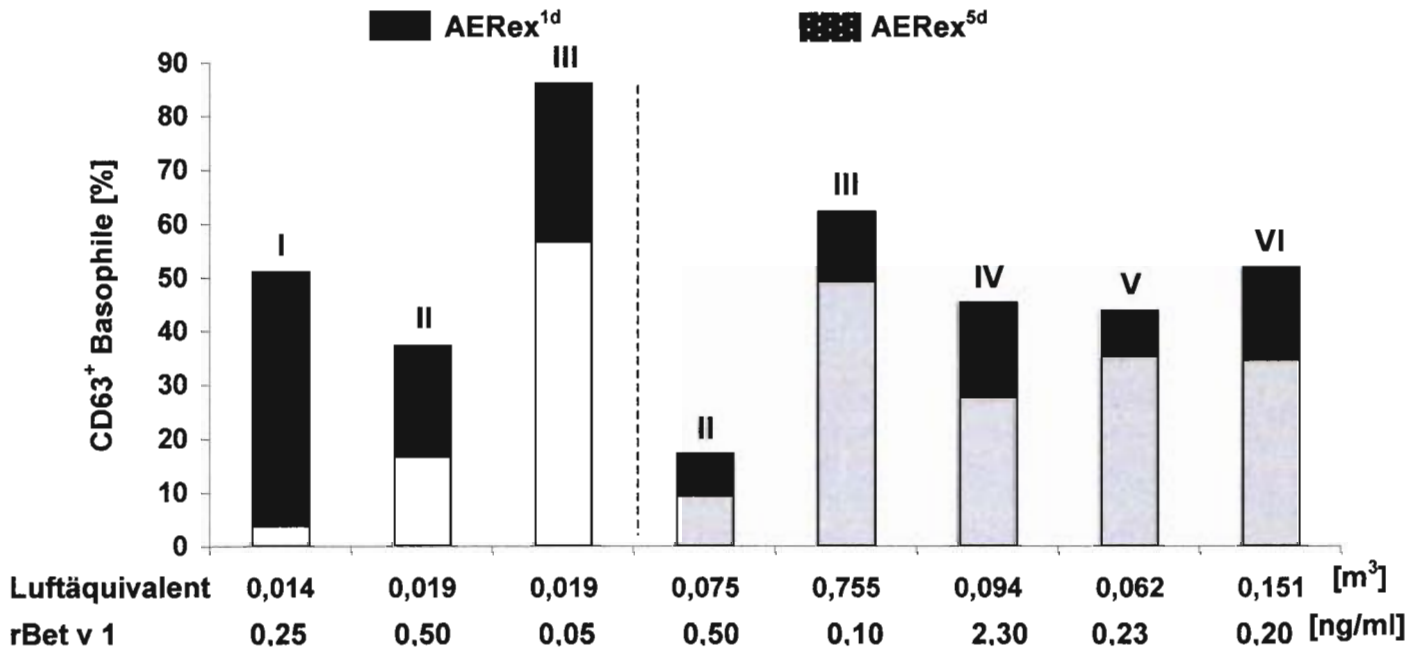


Abb.19: Einfluss von AERex auf die rBet v 1-induzierte CD63 Hochregulation basophiler Granulozyten von 6 Birkenpollenallergikern. Blut von Patient II und III wurde sowohl mit AERex<sup>1d</sup> als auch mit AERex<sup>5d</sup> getestet. Gezeigt wird der maximale Effekt nach Inkubation mit rBet v 1 (0,05-2,3 ng/ml) und AERex (0,007-0,755 m<sup>3</sup>, schwarze Säulen oder gefüllte Histogramme) im Vergleich zu rBet v 1 allein und DMSO (< 0,02 %, weiße Säulen oder ungefüllte Histogramme). Die Variabilität der CD63 Expression innerhalb eines Versuchansatzes nach Stimulation mit rBet v 1 (0,05-2,30 ng/ml) war geringer als  $\pm 1,5$  %.

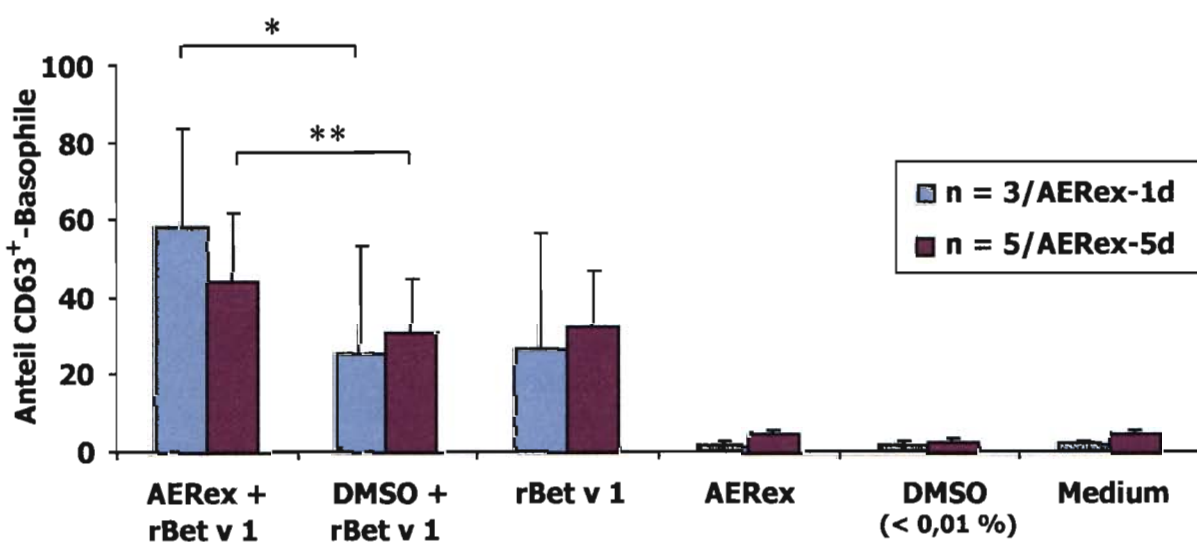


Abb.20: Maximale Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Inkubation mit AERex<sup>1d</sup> (3 Patienten) und AERex<sup>5d</sup> (5 Patienten) sowie rBet v 1. \* p=0,05; \*\* p=0,003;

## 4.4 Nichtallergisches Kontrollkollektiv

Basophile Granulozyten der nichtallergischen Kontrollgruppe zeigten keinerlei Aktivierung bei Inkubation mit ausschließlich rBet v 1, AERex oder DMSO, sowie keinerlei Aktivierung bei Koinkubation von rBet v 1 und AERex oder rBet v 1 und DMSO (siehe Abb.21).

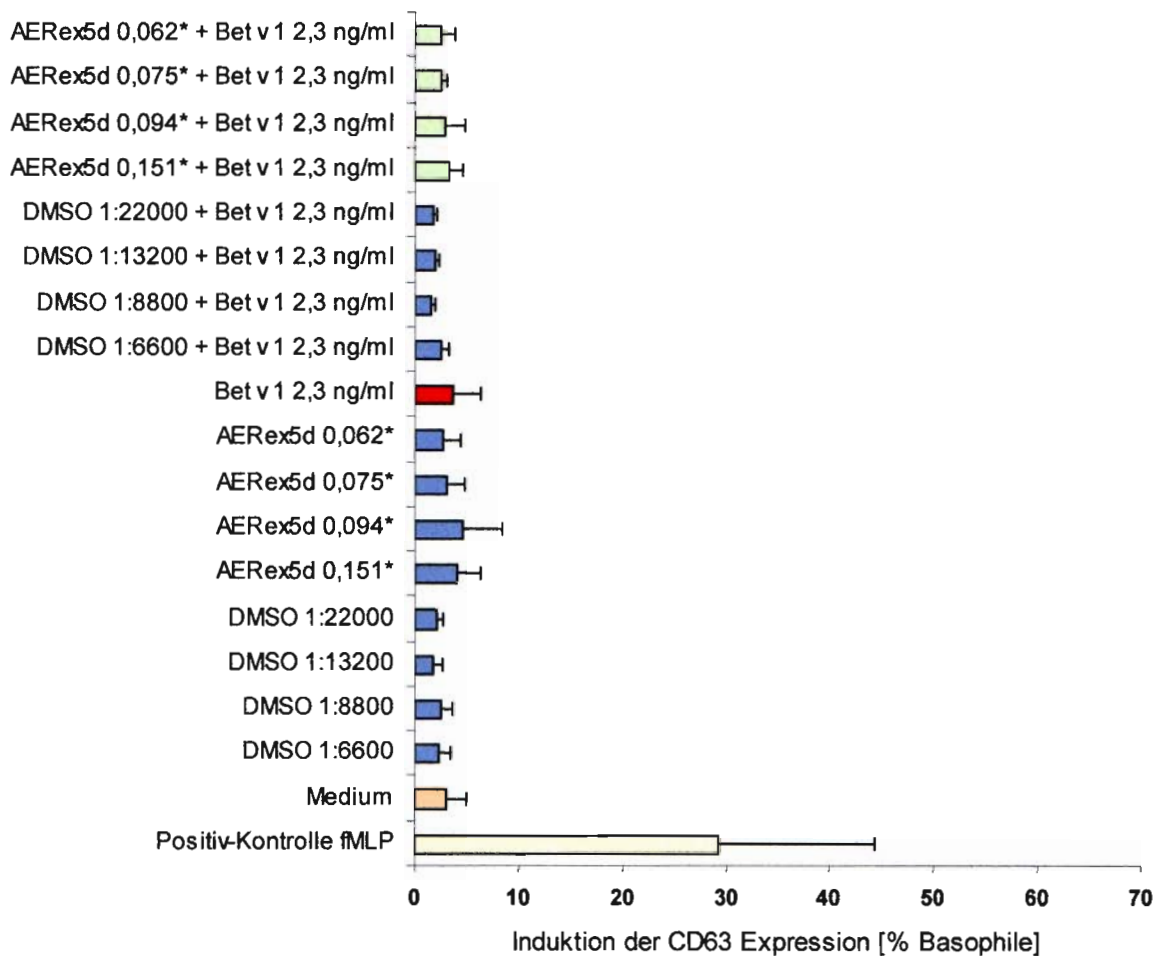


Abb.21: Basophilenaktivierung bei Nichtallergikern (n=5), \* Luftäquivalente [m<sup>3</sup>];



## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis einer signifikant erhöhten CD63 Expression basophiler Granulozyten, die *in vitro* gegenüber AERex und rBet v 1 exponiert wurden, im Vergleich zu Basophilen, die allein mit Allergen aktiviert wurden. Die beobachteten Effekte waren dosisabhängig und zeigten sich nicht in Abwesenheit von rBet v 1. Bei nichtallergischen Probanden zeigte sich kein Einfluss auf die Basophilenaktivierung. Im Folgenden soll auf die Grundidee dieser Arbeit eingegangen werden, sowie auf weitere Studien innerhalb dieses Themenkomplexes, die den Anstoß für weiterführende Forschungsarbeit liefern. Unterschiede in der Methodik und der Ergebnisse sollen diskutiert werden.

### *Epidemiologie*

Atmosphärische Schwebstäube der feinen und ultrafeinen Fraktion ( $\leq$  Partikelmasse PM<sub>2,5</sub>) wurden mit zahlreichen Effekten auf die menschliche Gesundheit, einschließlich Erkrankungen des atopischen Formenkreises, in Verbindung gebracht. Eine Assoziation zwischen allergischen Atemwegserkrankungen und Exposition gegenüber atmosphärischen Umweltschadstoffen wurde epidemiologisch nachgewiesen. Dies scheint ein Faktor für die steigende Prävalenz und Krankheitsexazerbation von Asthma und Rhinokonjunktivitis in der Bevölkerung zu sein [23, 29, 54, 63]. DEP machen einen Großteil der inhalierten Umweltschadstoffe aus. Studien bewiesen, dass DEP beim Menschen als Adjuvanz an der Entwicklung von allergischen Atemwegserkrankungen teilnehmen, indem sie die spezifische IgE-Produktion unter Anwesenheit von Allergen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* quantitativ und qualitativ beeinflussen und die Th2 Zytokinproduktion, wie z.B. IL-4, IL-6, IL-10 und IL-13, als Antwort auf herkömmliche Allergene fördern. Ebenso fördern sie Entzündungsreaktionen der oberen Atemwege sowie die Einwanderung von Granulozyten und Lymphozyten in die Schleimhaut des Nasen-Rachen-Trakts [12, 13, 14].

### *Tiermodelle*

Die Gruppe um Takafuji et al untersuchte 1986 an Mäusen adjuvante Effekte von DEP bei intranasaler Applikation mit Ovalbumin. In 3wöchigem Abstand wurde Mäusen Ovalbumin allein oder in Kombination mit DEP intranasal appliziert. Die IgE

Antikörperproduktion war in den Mäusen nach Provokation mit der Kombination aus Ovalbumin und DEP deutlich höher als nach Provokation mit Ovalbumin allein [56].

### *Humane Experimente*

Die Arbeitsgruppe Diaz-Sanchez führte 1996 Untersuchungen am menschlichen oberen Respirationstrakt durch. Die Probanden wurden mit Kochsalz oder DEP nasal provoziert. Es wurde jeweils vor und 18h nach Provokation eine nasale Lavage durchgeführt und die mRNA für Zytokine in den enthaltenen Zellen gemessen. Vor Applikation waren lediglich Interferon- $\gamma$ , IL-2 und IL-13 mRNA nachweisbar. Nach Applikation von DEP produzierten die Zellen nachweislich mRNA für IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und Interferon- $\gamma$ . Die erwähnte mRNA-Expression war im Vergleich zu Werten vor der Provokation signifikant verstärkt. Ebenso waren 4 Tage nach nasaler Provokation mit DEP erhöhte IgE Werte nachweisbar. Nach Provokation mit Kochsalz waren weder erhöhte mRNA Expression noch erhöhte IgE Werte nachweisbar [14]. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte 2000 den Histamingehalt der nasalen Lavage allergischer Probanden nach nasaler Provokation mit Allergen allein oder in Kombination mit DEP. Provokation mit DEP allein zeigte hierbei keinen Effekt. Eine Provokation mit DEP und Allergen resultierte in dreifach höheren Histaminkonzentrationen als mit Allergen alleine [13].

### *Mechanismen*

Es gibt zunehmende experimentelle Beweise dafür, dass die an den Partikeln adsorbierten organischen Substanzen für die adjuvanten Effekte der DEP, unabhängig von der Partikelstruktur, verantwortlich sind. [4, 5, 11, 24, 55, 58, 60]. Solche Verbindungen können auf Grund ihrer Lipophilie mit verschiedensten Zellen der Immunabwehr, basophile Granulozyten eingeschlossen, interagieren und zu einer Aufrechterhaltung und Exazerbation der allergischen Entzündungsreaktion führen [27]. So konnte gezeigt werden, dass organischer Dieseleruss-Extrakt (DEPex) basophile Granulozyten zur Degranulation und erhöhten sowie prolongierten IL-4 Produktion anregt [11]. Basophilen-Reinkulturen wurden mit Allergenextrakten und DEPex allein oder in Kombination inkubiert. Nach Exposition mit DEPex waren eine signifikant höhere IL-4-Expression sowie Histaminausschüttung nachweisbar als nach alleiniger Allergenexposition. Dieser Effekt von DEPex war dosisabhängig und sowohl bei Zellen allergischer als auch nichtallergischer Patienten nachweisbar.

DEPex induzierten eine IgE-unabhängige IL-4 Expression und Histaminausschüttung in hoch angereicherten Basophilenpopulationen. Bei diesen Experimenten konnte kein synergistischer Effekt von DEPex und Allergen auf die *in vitro* IL-4 Produktion nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass Basophile einen direkten Angriffspunkt für organische Verbindungen, wie sie im Dieselruß vorhanden sind, darstellen [11].

Mehrere Studien haben neue Einsichten bezüglich der möglichen Beteiligung von Basophilen an der Initiierung und Ausdehnung der spezifischen IgE-abhängigen allergischen Entzündungsantwort geliefert und unterstützen Spekulationen, die über ihre anerkannte Rolle als Effektorzellen hinausgehen [10, 19]. Während des Verlaufs von allergischen Reaktionen migrieren Basophile ins Gewebe und nehmen an Entzündungsreaktionen teil. Nach Quervernetzung der hochaffinen IgE Rezeptoren (FcεRI) oder als Antwort auf andere Stimuli, setzen Basophile rapide Mediatoren wie Histamine und Leukotriene, sowie regulatorische Zytokine wie IL-4 und IL-13 frei [19]. Daher entschied man sich in dieser Studie ebenfalls für die basophilen Granulozyten als zu untersuchende Zellen. Zudem sind sie sehr leicht aus dem peripheren Blut zu gewinnen.

#### *Quellen der PAK: Unterschiede*

In den zuvor beschriebenen Studien wurde DEPex mit Hilfe eines Dieselmotors als Quelle direkt generiert. In der vorliegenden Arbeit kam ein Umweltschadstoffgemisch zur Anwendung, welches an einer mehrspurigen befahrenen Straße gesammelt wurde. Dies kommt somit in der Zusammensetzung der tatsächlich von Bewohnern stark verkehrsbelasteter Umgebung eingeatmeten Luft näher. Es wurde untersucht, ob AERex direkte Effekte auf basophile Granulozyten hat, oder synergistische Effekte auf die rBet v 1-induzierte Stimulation der basophilen Granulozyten aufweist. Für diese *in vitro* Experimente wurden zwei organische Extrakte urbanen Aerosols ( $\leq$  PM<sub>2,5</sub>) mit quantitativ unterschiedlicher PAK Zusammensetzung verwendet.

#### *Testsysteme: Unterschiede*

Da Basophile verschiedener Spendergruppen unterschiedliche Aktivierungsvorraussetzungen haben [10], wurden Basophile sowohl von nicht-allergischen als auch von allergischen Blutspendern untersucht. Während vorangehende Studien Histaminausschüttung und Zytokinproduktion als Aktivierungskorrelat der Basophilen

maßen [11], verwendete man diesmal einen Basophilen-Aktivierungs-Test, der die CD63 Expression auf Basophilen misst. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Basophilendegranulation zu einer erhöhten CD63 Expression auf der Plasmamembran führt. Zudem wurde eine Korrelation sowohl des Ausmaßes als auch der Kinetik der Histaminausschüttung und der CD63 Expression auf basophilen Granulozyten nachgewiesen [28]. Es wurden keine signifikanten quantitativen Unterschiede zwischen Histaminausschüttung und Prozentsatz an CD63-exprimierenden Zellen nach Aktivierung basophiler Granulozyten mit anti-IgE oder Gräserpollen gemessen [46]. Man entschied sich für dieses Testverfahren, da es eine sehr schnelle und zuverlässige Methode darstellt, die Aktivierung der basophilen Granulozyten zu messen.

#### *Allergene: Unterschiede*

In anderen Studien wurde ebenfalls der Einfluss auf die allergeninduzierte Aktivierung gemessen. Als Allergen wurde hierbei Hausstaubmilbenallergen Der p 1 [13] oder Ambrosiaallergen [12] verwendet. Bei dieser Arbeit entschied man sich für das Birkenpollenallergen rBet v 1, welches für einen Großteil der Allergien in Mittel- und Nordeuropa verantwortlich ist.

#### *Ergebnisse: Gemeinsamkeiten und Unterschiede*

Die erhobenen Daten zeigen, dass beide in umweltrelevanten Konzentrationen getesteten AERex Extrakte die rBet v 1-induzierte Basophilenaktivierung in Blutproben von allen untersuchten Birkenpollenallergikern signifikant erhöhen. Es zeigten sich klar synergistische Effekte, die in Abwesenheit von Allergen nicht auftraten. Ein direkter Effekt von AERex allein auf die Basophilenaktivierung war nicht nachzuweisen. Der Effekt von AERex war dosisabhängig. Die synergistischen Effekte wurden nur bei basophilen Granulozyten von atopischen Patienten beobachtet, nicht jedoch bei gesunden Probanden. Dies korreliert gut mit vorangegangenen Studien, die synergistische Effekte von DEP und Antigen auf die Th2-artige Zytokinproduktion nach *in vivo* durchgeführter nasaler oder bronchialer Provokation allergischer Probanden nachwiesen [12, 14]. Ein ähnlicher Effekt von DEPex auf die allergen-induzierte Mastzell-Degranulation wurde ebenfalls bereits beschrieben. Hierbei waren Parallelen zu durch Adenosin 5-Monophosphat verursachten Effekten aufgefallen. Adenosin, ein natürlicherweise vorkommendes

Purinnukleosid, potenziert die IgE-abhängige Histaminausschüttung von humanen Lungen-Mastzellen *in vitro*. Nasale Provokation mit Adenosin verstärkt die Symptome und Histaminausschüttung bei allergischen Probanden, aber nicht bei gesunden Kontrollprobanden [13].

Neuere Untersuchungen ergaben, dass DEPex die IgE-unabhängige basophile Zytokinproduktion und Histaminausschüttung wirksam einleiten kann [11]. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie verwendete man organische Extrakte frisch gesammelter Umweltpartikel ( $\leq$  PM 2,5) mit unterschiedlichem PAK Gehalt. Nach Auftrennung urbaner PM 10 in feine und grobe Partikelgröße wurde der größte proinflammatorische Effekt (Produktion von TNF, IL-6, COX-2) auf alveoläre Makrophagen durch Material der groben Fraktion getriggert. Diese enthielt 90 bis 95% des stimulatorischen Materials der untersuchten PM10 [3]. Primäre Epithelzellen reagierten auf die grobe Fraktion mit höherer IL-8 und COX-2 Expression als durch die feine oder ultrafeine Fraktion induziert wurde. PM jeder Größe induzierte oxidativen Stress in Epithelzellen. Im Vergleich zur PM der Umgebungsluft induzierte Diesel PM lediglich eine minimale Zytokinantwort in Alveolarmakrophagen und Epithelzellen. Grobe und feine Fraktion der Umgebungsluft konnten die LPS induzierte TNF Ausschüttung inhibieren, während Silikon, vulkanische Asche oder Kohle keinen inhibitorischen Effekt zeigten. Dieselpartikel beeinflussten weder die Zytokin mRNA Induktion noch die Protein-Produktion, jedoch die Zytokinausschüttung der Zellen. Grobe und feine PM der Umgebungsluft inhibierte sowohl die mRNA Induktion als auch die Protein-Produktion. Die Studiengruppe um Lin beschrieb 2005 einen höheren Anteil an verkehrsrelevanten Metallen (Pb, Cd, Cu, Zn, Ba und Ni) in Nanopartikeln als in Partikeln anderer Größe. Der Anteil an Ag, Ba, Cd, Pb, Sb, V und Zn in Nanopartikeln war stark mit Diesel Brennstoff assoziiert [32].

Abweichende chemische Zusammensetzungen und unterschiedliche Verteilung feiner und ultrafeiner Partikel in PM der Umgebungsluft und Diesel PM könnten das Fehlen synergistischer Effekte von DEPex und Allergen auf Basophile, sowie die allergenunabhängige IL-4 Produktion und Histaminausschüttung in Devouassoux Studie erklären [11]. So wurden zum einen in oben erwähnter Studie gereinigte Basophile mit Allergen bzw. DEPex beimpft, während in der vorliegenden Studie heparinisiertes Vollblut verwendet wurde. Zum anderen kam in der vorliegenden Arbeit ein komplexes Umweltextrakt im Gegensatz zu generiertem DEPex zur

Anwendung. Da die DEPex Aktivität nicht mit genau definierten Werten von Benzo[a]Pyren korreliert wurde, ergeben sich Schwierigkeiten, die Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit zu vergleichen.

Die stärksten Effekte auf die Basophilenaktivierung wurden nach Stimulation mit AERex<sup>1d</sup> beobachtet, welches im Winter 2003 gesammelt wurde. Es beinhaltet eine zwanzigfach höhere Konzentration an PAK als AERex<sup>5d</sup>, welches im Sommer 2003 gesammelt wurde. Dies lässt vermuten, dass die biologische Aktivität von AERex mit dem Gehalt an bestimmten organischen Substanzen, im besonderen PAK, korreliert. Es besteht eine signifikante Fluktuation der PAK-Konzentrationen im Verlauf des Jahres mit normalerweise zwei- bis zehnfach höheren PAK-Konzentrationen in den Wintermonaten [6, 52]. Bei niedrigeren Temperaturen brauchen Kraftfahrzeuge längere Zeit bis sie die optimale Arbeitstemperatur erreichen. Dies bewirkt eine höhere Emission von PAK [33]. Signifikante Unterschiede des PAK-Gehaltes am Anfang und am Ende einer Heizperiode weisen zusätzlich auf einen Einfluss der PAK-Emissionen durch heizende Haushalte hin. Im Großraum München sind im Winter häufig Inversionswetterlagen zu beobachten, die einen Austausch in der Atmosphäre beeinträchtigen und somit zu einer Schadstoffanreicherung in der untersten Luftschicht führen [33, 52]. Bei niedrigeren Temperaturen steigt der Anteil der partikelgebundenen PAK. Chemische Reaktionen zwischen PAK und atmosphärischen Photooxidantien wie z.B. O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> und OH können die PAK-Konzentration in der Atmosphäre zusätzlich beeinflussen. Zudem waren Frühjahr und Sommer 2003 sehr heiß, was zu einer hohen UV-Strahlung und hohen Ozonkonzentrationen führte. Dies verursachte Photodegradation und Oxidation der PAK sowie eine leichtere atmosphärische Zerstreuung der Schadstoffe [33].

Die Zusammensetzung der organischen Phase von Umweltaerosolen hängt von der Jahreszeit bei Sammlung, dem Sammelort, Wetterbedingungen und anderen Faktoren ab. Die organische Phase setzt sich aus über 20000 Substanzen zusammen, von denen bisher nur ein Drittel identifiziert werden konnte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den verwendeten Extrakten andere Substanzen als die PAK zu dem beobachteten Effekt beitragen. Jedoch zeigt die HPLC-Analyse von AERex, sowie der Vergleich mit anderen Studien, die adjuvante Effekte von polyaromatischen Verbindungen untersuchten [5, 27, 60], dass zum Großteil PAK zu der Verstärkung der rBet v 1-induzierten Basophilenaktivierung bei Birkenpollenallergikern beitragen. Da beide organischen Extrakte zu

unterschiedlichen Jahreszeiten und über unterschiedliche Zeitdauer gesammelt wurden, muss diese Verstärkung als ein allgemeiner Effekt von AERex auf humane basophile Granulozyten angesehen werden.

### *Wirkungsweise*

Die Bioverfügbarkeit von PM-assoziierten PAK ist durch Studien innerhalb der Krebsforschung bekannt. Um die Verbindung zwischen PAK und typischen Transport-Partikeln zu analysieren, untersuchte die Studiengruppe um Gerde [21] das Ausmaß der Freisetzung und die metabolischen Prozesse von an Dieselruß adsorbiertem B[a]P. Hunde wurden durch Inhalation dem rußadsorbierten B[a]P ausgesetzt. Nach Ablagerung in den Alveolen wurde eine Fraktion des B[a]P rapide von Rußpartikeln abgetrennt und in den Blutkreislauf adsorbiert. Die verbleibende Fraktion B[a]P blieb an Rußpartikel gebunden bis 5,6 Monate später in der Lunge nachweisbar. Der Anteil an schnell adsorbiertem B[a]P erschien, abgesehen von niedrigen Konzentrationen an Phase I und Phase II B[a]P Metaboliten, unmetabolisiert im Blut. Somit wurde die Relevanz der Adsorption durch das alveoläre Epithel als wichtige Eintrittspforte organischer Komponenten, im Besonderen PAK, in den menschlichen Organismus verdeutlicht.

Organische Komponenten, hierunter vor allem die oxygenierten PAK Derivate wie Quinone und Ketone, führen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) durch die Induktion von Cytochrom P4501A [39] und können direkten oxidativen Stress ausüben [38]. Diese Erkenntnisse beruhen größtenteils auf *in vitro* Studien, in denen ROS von Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Epithelzellen nach Stimulation mit DEP oder ihrer chemischen Bestandteile produziert werden. In murinen Modellen konnte eine Behandlung mit Antioxidantien die DEP verstärkte IgE Produktion blockieren und ihre proinflammatorischen und adjuvanten Effekte abschwächen [49]. ROS können zahlreiche Signalwege und zelluläre Ereignisse aktivieren. Diese Effekte stehen im Verdacht, Gesundheitsbeeinträchtigungen, wie chronische Entzündungsreaktionen, Karzinogenese, Alterungsprozess oder akute symptomatische Reaktionen des Respirationstrakts, zu verursachen oder zu verschlimmern [9, 31, 49, 53]. Der Einfluß dieser metabolischen Vorgänge auf humane polymorphonukleäre Granulozyten wurde bereits beschrieben. So beeinflussen Partikel Entzündungsreaktionen auf zellulärer Ebene, indem sie die Enzymausschüttung aus den Granula, sowie die

Synthese und Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren IL-8, PGE<sub>2</sub> und Leukotrien B<sub>4</sub> modulieren. Organische Extrakte führen zu einem schnellen und starken Anstieg der Sauerstoffradikalfreisetzung [11, 24]. Dies könnte ebenfalls für den modulierenden Effekt von AERex auf humane Basophile verantwortlich sein [27]. Zudem bestehen verschiedene genetische Varianten der Glutathion-S-Transferase, welche im Sauerstoffmetabolismus und bei Entgiftungsprozessen der Xenobiotika eine Rolle spielt. Kürzlich durchgeführte Studien zeigten, dass diese genetischen Varianten die Empfindlichkeit auf die DEP-induzierte Verstärkung der allergischen Reaktionen beeinflussen [49]. Diese Untersuchungen konzentrierten sich auf in den Atemwegen exprimierte Gene, die bei der Detoxifikation von auch in DEP enthaltenen Chemikalien involviert sind. So konjugieren diese Genprodukte reaktive Zwischenverbindungen mit Glutathion. Genetische Varianten die durch eine Abnahme oder Fehlen dieser Enzymfunktion gekennzeichnet sind, zeichnen sich durch Atemwegshyperreaktivität, Asthma und erhöhtes Lungenkrebsrisiko bei Rauchern aus. Patienten mit erniedrigter Enzymfunktion zeigten bei nasaler Provokation mit Allergen und DEP erhöhte Empfindlichkeit für adjuvante Effekte der DEP [22]. Dies kann sich ebenfalls auf der von uns untersuchten zellulären Ebene der Basophilen auswirken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass AERex in umweltrelevanten Konzentrationen die Fähigkeit besitzt, die rBet v 1-induzierte Basophilenaktivierung von allergischen Probanden zu erhöhen. Dies lässt eine wichtige Rolle der organischen Verbindungen, vor allem PAK, in der Chronifizierung und Verstärkung der IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen vermuten. Basophile Granulozyten stellen eine Hauptquelle für frühe IL-4 Produktion in allergischen Patienten nach spezifischem Antigenkontakt dar. Daher können synergistische Effekte zwischen AERex und natürlicher Bet v 1-Exposition ebenfalls Auswirkungen auf primäre Sensibilisierung mit anderen ubiquitären Aeroallergenen haben.



## 6 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien haben die hohe Prävalenz der IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen mit einer erhöhten Exposition gegenüber durch Verkehrsaufkommen bedingten Umweltschadstoffen wie zum Beispiel Dieselrußpartikeln (DEP) in Verbindung gebracht. Es gibt zunehmend experimentelle Nachweise für die Beteiligung organischer Komponenten der DEP, vor allem der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe (PAK), an der Entwicklung und Chronifizierung allergischer Atemwegserkrankungen. In dieser Studie untersuchten wir den Einfluss organischer Umweltextrakte (AERex) mit unterschiedlichen PAK-Konzentrationen auf die Aktivierung von humanen basophilen Granulozyten.

Vollblutproben von sechs Birkenpollenallergikern sowie fünf Kontrollpersonen wurden wiederholt in der Anwesenheit von AERex mit oder ohne rBet v 1 inkubiert. Anschließend wurden die Basophilen mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf ihre CD63 Expression als Maß für die Basophilenaktivierung analysiert.

Basophile, die *in vitro* gegenüber AERex und rBet v 1 exponiert wurden, exprimierten CD63 signifikant 20 bis 40 % höher als Basophile die allein mit Allergen aktiviert wurden. AERex verursachte synergistische, dosisabhängige Effekte mit rBet v 1, zeigte aber keinen Einfluss auf die Basophilenaktivierung von nichtallergischen Probanden. Der Effekt von AERex auf die CD63-Hochregulation wurde in allen Blutproben aller Patienten beobachtet und zeigte sich nicht in Abwesenheit von rBet v 1. Die stärksten Effekte der Basophilenaktivierung wurden nach Stimulation durch AERex mit dem höchsten PAK-Gehalt beobachtet.

Die Fähigkeit von AERex, in natürlich vorkommenden Konzentrationen die Basophilenaktivierung Birkenpollenallergiker zu erhöhen, lässt eine wichtige Rolle organischer Komponenten des urbanen Aerosols in der Aggravation IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen vermuten. Dies könnte ein neuer Aspekt der Wirkung unspezifischer Stimuli bei der klinischen Manifestation allergischer Entzündungsreaktionen sein.

**IV Literaturverzeichnis**

1. Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen, Fachinformation Umwelt und Gesundheit, Dieselmotor-Emissionen, 2002.
2. Bascom R, Kulle T, Kagey-Sobotka A, Proud D. Upper respiratory tract environmental tobacco smoke sensitivity. *Am Rev Respir Dis* 143(6) (1991) 1304-1311.
3. Becker S, Mundandhara S, Devlin R B, Madden M. Regulation of cytokine production in human alveolar macrophages and airway epithelial cells in response to ambient air pollution particles: Further mechanistic studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 207 (2005) 269-275.
4. Bömmel H, Haake M, Luft P, Horejs-Hoeck J, Hein H, Bartels J, Pöschl U, Kracht M, Duschl A. The diesel exhaust component pyrene induces expression of IL-8 but not of eotaxin. *Int Immunopharmacol* 3(10-11) (2003) 1371-1379.
5. Bömmel H, Li-Weber M, Serfling E, Duschl A. The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 105(4) (2000) 796-802.
6. Boumiza R, Monneret G, Forissier M-F, Savoye J, Gutowski M-C, Powell WS, Bienvenu J. Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63. *Clin Exp Allergy* 33 (2003) 259-265.
7. Caricchia AM, Chiavarini S, Pezza M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy). *Atmos Environ* 33(23) (1999) 3731-3738.
8. Corbo GM, Forastiere F, Dell'Orco V, Pistelli R, Agabiti N, De Stefanis B, Ciappi G, Perucci CA. Effects of environment on atopic status and respiratory disorders in children. *J Allergy Clin Immunol* 92(4) (1993) 616-623.

9. Dellinger B, Pryor WA, Cueto R, Squadrito GL, Hedge V, Deutsch WA. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem Res Toxicol* 14(10) (2001) 1371-1377.
10. Devouassoux G, Foster B, Scott LM, Metcalfe DD, Prussin C. Frequency and characterization of antigen-specific IL-4- and IL-13-producing basophils and T cells in peripheral blood of healthy and asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 104(4 Pt 1) (1999) 811-819.
11. Devouassoux G, Saxon A, Metcalfe D, Prussin C, Colomb M, Brambilla C, Diaz-Sanchez D. Chemical constituents of diesel exhaust particles induce IL-4 production and histamine release by human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 109 (2002) 847-53.
12. Diaz-Sanchez D. The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy* 52(38) (1997) 52-56; discussion 57-58.
13. Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol* 106(6) (2000) 1140-1146.
14. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Casillas A, Dotson AR, Saxon A. Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin Immunol* 98(1) (1996) 114-123.
15. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 158(5) (1997) 2406-2413.
16. Dreborg S, Backman A, Basomba A, Bousquet J, Dieges P, Malling H. Skin tests used in type I allergy testing. *Allergy* 44(10) (1989) 1-59.

17. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, Schuerwegh AJ, Dellerck LS, Stevens WJ. In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 34 (2004) 332-339. Review
18. Fahy O, Tsicopoulos A, Hammad H, Pestel J, Tonnel AB, Wallaert B. Effects of diesel organic extracts on chemokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J Allergy Clin Immunol* 103(6) (1999) 1115-1124.
19. Falcone F, Haas H, Gibbs B. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 96(13) (2000) 4028-38.
20. Fujieda S, Diaz-Sanchez D, Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces in vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19(3) (1998) 507-512.
21. Gerde P, Muggenburg B A, Lundborg M, Dahl A R. 2001. The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: Bioavailability, metabolism and dosimetry of inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis* 22 (2001) 741-749.
22. Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet* 363(9403) (2004) 119-125.
23. Heinrich J, Wichmann HE. Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4(5) (2004) 341-348.
24. Hitzfeld B, Friedrichs KH, Ring J, Behrendt H. Airborne particulate matter modulates the production of reactive oxygen species in human polymorphonuclear granulocytes. *Toxicology* 120(3) (1997) 185-195.
25. ISAAC. 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* 351(9111) (1998) 1225-1232.
26. Kayser F, Bienz K, Eckert J, Zinkernagel R. *Medizinische Mikrobiologie*. 10. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001.
27. Kepley CL, Lauer FT, Oliver JM, Burchiel SW. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a) pyrene (BaP) and BaP-quinones, enhance IgE-mediated histamine release and IL-4 production in human basophils. *Clin Immunol* 107(1) (2003) 10-19.
28. Knol E, Mul F, Jansen H, Calafat J, Roos D. Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 88 (1991) 328-38.
29. Krämer U, Koch T, Ranft U, Ring J, Behrendt H. Traffic-related air pollution is associated with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology* 11(1) (2000) 64-70.
30. Lambert C, Guilloux L, Dzvinga C, Gourgaud-Massias C, Genin C. Flow Cytometry versus Histamine Release Analysis of In Vitro Basophil Degranulation in Allergy to Hymenoptera Venom. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 52B (2003) 13-19.
31. Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 169(8) (2002) 4531-4541.
32. Lin C C, Chen S J, Huang K L, Hwang W I, Chang-Chien G P, Lin W Y. Characteristics of metals in nano/ultrafine/fine/coarse particles collected beside a heavily trafficked road. *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8113-8122.

33. Lintelmann J, Fischer K, Karg E, Schröppel A. Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygenated polycyclic hydrocarbons in aerosol samples by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 381(2) (2005) 508-519.
34. Menz G, Dolecek C, Schönheit-Kenn U, Ferreira F, Moser M, Schneider T, Suter M, Boltz-Nitulescu G, Ebner C, Kraft D, Valenta R. Serological and skin-test diagnosis of birch pollen allergy with recombinant Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 26(1996) 50-60.
35. Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, Donnelly LE, Rogers DF, Kinnersley R, Chung KF, Barnes PJ, Ashmore M, Newman-Taylor A. Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* 162(1) (2000) 161-166.
36. Orpegen Pharma. Basotest – Test kit for the quantitative determination of the degranulation of basophilic granulocytes in heparinized human whole blood. *Operators Manual Basotest 6* (1997) 1-8.
37. Peterson B, Saxon A. Global increases in allergic respiratory disease: the possible role of diesel exhaust particles. *Ann Allergy Asthma Immunol* 77(4) (1996) 263-268; quiz 269-270.
38. Pinkus R, Weiner LM, Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* 271(23) (1996) 13422-13429.
39. Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res* 48(17) (1988) 4776-4782.

40. Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 1998.
41. Ricci G, Capelli M, Miniero R, Menna G, Zannarini L, Dillon P, Masi M. A comparison of different allergometric tests, skin prick test, Pharmacia UniCAP<sup>®</sup> and ADVIA Centaur<sup>®</sup>, for diagnosis of allergic diseases in children. *Allergy* 58(1) (2003) 38-46.
42. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clinical and Experimental Allergy* 30 (2000) 194-200.
43. Ring J. Allergy and modern society: does 'Western life style' promote the development of allergies? *Int Arch Allergy Immunol* 113(1-3) (1997) 7-10.
44. Ring J, Krämer U, Schäfer T, Behrendt H. Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 13(6) (2001) 701-708.
45. Ring J. *Angewandte Allergologie*, 3. Auflage. Medizin & Wissen, Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH&Co.KG, München, 2004.
46. Saint-Laudy J, Sabbah A, Vallon C, Guerin JC. Analysis of anti-IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. *Inflamm Res* 47 (1998) 401-408.
47. Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandström T, Holgate ST, and Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 159(3) (1999) 702-709.
48. Sanz ML, Maselli JP, Gamboa PM, Oehling A, Dieguez I, de Weck A. Flow cytometric basophil activation test: a review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 12(3) (2002) 143-54.

49. Saxon A, Diaz-Sanchez D. Air pollution and allergy : you are what you breathe. *Nat Immunol* 6(3) (2005) 223-226.
50. Schäfer T, Ring J. Epidemiology of allergic diseases. *Allergy* 52(38) (1997) 14-22.
51. Schauer C, Niessner R, Pöschl U. Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artefacts. *Environ Sci Technol* 37(13) (2003) 2861-2868.
52. Schnelle-Kreis J, Gebefügi I, Welzl G, Jaensch T, Kettrup A. Occurrence of particle-associated polycyclic aromatic compounds in ambient air of the city of Munich. *Atmos Environ* 35(1) (2001) 71-81.
53. Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med* 31(9) (2001) 1132-1138.
54. Studnicka M, Hackl E, Pischinger J, Fangmeyer C, Haschke N, Kühr J, Urbanek R, Neumann M, Frischer T. Traffic-related NO<sub>2</sub> and the prevalence of asthma and respiratory symptoms in seven year olds. *Eur Respir J* 10(10) (1997) 2275-2278.
55. Suzuki T, Kanoh T, Kanbayashi M, Todome Y, Ohkuni H. The adjuvant activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice. *Alerugi* 42(8) (1993) 963-968.
56. Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, Muranaka M. Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J Allergy Clin Immunology* 79 (1987) 639-45



57. Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 156(1) (1997) 36-42.
58. Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A, Saxon A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *J Allergy Clin Immunol* 95(1) (1995) 103-115.
59. Tresch S, Holzmann D, Baumann S, Blaser K, Wüthrich B, Cramer R, Schmid-Grendelmeier P. In vitro and in vivo allergenicity of recombinant Bet v 1 compared to the reactivity of natural birch pollen extract. *Clinical & Experimental Allergy* 33(8) (2003) 1153-1160.
60. Tsien A, Diaz-Sanchez D, Ma J, Saxon A. The Organic Component of Diesel Exhaust Particles and Phenantrene, a Major Polyaromatic Hydrocarbon Constituent, Enhances IgE Production by IgE-Secreting EBV-Transformed Human B Cells in Vitro. *Toxicol appl Pharmacol* 142 (1997) 256-263.
61. Valenta R. Recombinant allergen-based concepts for diagnosis and therapy of Type I allergy. *Allergy* 57(71) (2002) 66-67.
62. Valenta R, Vrtala S, Laffer S, Spitzauer S, Kraft D. Recombinant allergens. *Allergy* 53 (1998) 552-561.
63. Van Vliet P, Knape M, de Hartog J, Janssen N, Harssema H, Brunekreef B. Motor vehicle exhaust and chronic respiratory symptoms in children living near freeways. *Environ Res* 74(2) (1997) 122-132.
64. Winther L, Moseholm L, Reimert C M, Stahl Skov P, Kaergaard Poulsen L. Basophil histamine release, IgE, eosinophil counts, ECP, and EPX are related to the severity of symptoms in seasonal allergic rhinitis. *Allergy* 54 (1999) 436-445.

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

**V Dank**

Der erste Dank gilt Frau Prof. Dr. H. Behrendt, Leiterin des Zentrum für Allergie und Umwelt, sowie Herrn Prof. Dr. Dr. J. Ring, ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München für die Möglichkeit, an ihren Einrichtungen zu promovieren.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Wolfgang Schober und Frau PD Dr. Bernadette Eberlein für die hervorragende Betreuung, ebenso an Herrn PD Dr. Jeroen Buters als Arbeitsgruppenleiter. Vielen Dank auch an Stefanie Lubitz, Britta Dorn, Antje Wallmuth und Kilian Eyerich für stete Hilfestellungen. An Britta Dorn im Besonderen ein Dankeschön für die LPS-Bestimmung, dem Team der GSF für die Extraktgewinnung, GC-MS Analyse sowie HPLC Analyse. Diese Arbeit war nur durch die gute Zusammenarbeit der Mitarbeiter und hervorragende Atmosphäre im ZAUM möglich.

Meinen Freunden und meiner Familie gilt mein letzter Dank für ihre große Unterstützung. Widmen möchte ich diese Arbeit meiner Mutter in liebevoller Erinnerung.

**VI Lebenslauf**

Name: Belloni  
 Vornamen: Benedetta Christina  
 Geburtsdatum/-ort: 16.03.1979, Berlin  
 Familienstand: ledig  
 Konfession: römisch-katholisch  
 Staatsangehörigkeiten: deutsch, italienisch

**Schulbildung**

1985 – 1989 Grundschule am Gernerplatz, Puchheim  
 1989 – 1990 Gymnasium Puchheim  
 1990 – 1993 German School New York, USA  
 1993 – 1995 Sozialwissenschaftliches Gymnasium Bertolt Brecht, München  
 1995 – 1998 Gymnasium Puchheim, naturwissenschaftlicher Zweig  
 1998 Abitur (Note: 1,9)

**Hochschulbildung**

SS 1999 – WS 2005/06 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
 03/2001 Physikum (Note: 2)  
 03/2002 Erstes Staatsexamen (Note: 2)  
 03/2004 Zweites Staatsexamen (Note: 2)  
 10/2005 Drittes Staatsexamen (Note: 2)

**Praktisches Jahr**

10/2004 – 02/2005 Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München  
 02/2005 – 04/2005 Chirurgische Abteilung, Städtisches Krankenhaus München- Harlaching  
 04/2005 – 05/2005 Chirurgische Abteilung, Austin Health Clinical School, Melbourne, Australien  
 05/2005 – 09/2005 Abteilung für Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus München-Harlaching

**Beruflicher Werdegang**

seit 01/2006 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein Technische Universität München

## VII Anhang

rBet v 1 [ng/ml]	Patient I*	Patient II*	Patient III*	Patient IV*	Patient V*	Patient VI*
4545,5		82,75		28,26		
454,55	72,04	84,16	92,57	41,62	76,97	
45,454	88,84	81,93	97,81	46,85	87,97	68,66
4,5454	81,05	85,82	93,23	55,76	90,34	84,98
0,4545	64,18	37,54	20,49	17,51	44,96	17,55
0,0454	2,59	7,3	1,35	1,42	3,31	3,21
0,0045	3,23	5,24	1,55	1,74	4,02	1,88
0,001	4,24	3,61	3,29	2,14	7,82	

Tab.6: rBet v 1-Titration des Patientenkollektivs, \*Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Patient I*	Patient I*	Mittelwert*
Medium	1,74	1,43	1,59
DMSO 1:15400		1,03	1,03
DMSO 1:22000	1,35	0,93	1,14
DMSO 1:28600		1,56	1,56
DMSO 1:44000		1,22	1,22
AERex <sup>1d</sup> 0,027m <sup>3</sup>		1,44	1,44
AERex <sup>1d</sup> 0,019m <sup>3</sup>	1,24	2,28	1,76
AERex <sup>1d</sup> 0,014m <sup>3</sup>		0,73	0,73
AERex <sup>1d</sup> 0,009m <sup>3</sup>		0,72	0,72
rBet v 1 0,25ng/ml	32,52	3,8	18,16
DMSO 1:15400 + rBet v 1 0,25ng/ml		3,22	3,22
DMSO 1:22000 + rBet v 1 0,25ng/ml	16,13	3,22	9,68
DMSO 1:28600 + rBet v 1 0,25ng/ml		3,86	3,86
DMSO 1:44000 + rBet v 1 0,25ng/ml		10,02	10,02
AERex <sup>1d</sup> 0,027m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,25ng/ml		4,74	4,74
AERex <sup>1d</sup> 0,019m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,25ng/ml	44,58	11,12	27,85
AERex <sup>1d</sup> 0,014m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,25ng/ml		51,08	51,08
AERex <sup>1d</sup> 0,009m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,25ng/ml		6,13	6,13

Tab.7: Patient I, Versuche mit AERex<sup>1d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Patient II*	Patient II*	Patient II*	Mittelwert*
Medium	1,56	2,08	2,45	1,82
DMSO 1:15400	1,44			1,44
DMSO 1:22000	1,10			1,10
DMSO 1:28600	1,41			1,41
DMSO 1:33000	1,20			1,20
AERex <sup>1d</sup> 0,027m <sup>3</sup>	1,82			1,82
AERex <sup>1d</sup> 0,019m <sup>3</sup>	1,11		2,07	1,11
AERex <sup>1d</sup> 0,014m <sup>3</sup>	1,54			1,54
AERex <sup>1d</sup> 0,009m <sup>3</sup>	1,78			1,78
rBet v 1 0,5ng/ml	14,17	17,60	32,66	15,89
DMSO 1:15400 + rBet v 1 0,5ng/ml	18,74	16,05		17,40
DMSO 1:22000 + rBet v 1 0,5ng/ml	16,10	17,32	23,52	16,71
DMSO 1:28600 + rBet v 1 0,5ng/ml	20,31	16,80		18,56
DMSO 1:33000 + rBet v 1 0,5ng/ml	18,99	14,36		16,68
AERex <sup>1d</sup> 0,027m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,5ng/ml	16,36	15,10		15,73
AERex <sup>1d</sup> 0,019m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,5ng/ml	56,94	17,58	24,22	37,26
AERex <sup>1d</sup> 0,014m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,5ng/ml	20,85	15,62		18,24
AERex <sup>1d</sup> 0,009m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,5ng/ml	19,37	15,66		17,52

Tab.8: Patient II, Versuche mit AERex<sup>1d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Patient III*	Patient III*	Patient III*	Patient III*	Mittelwert*
Medium	2,29	2,36	2,67	3,40	2,68
DMSO 1:15400				4,00	4,00
DMSO 1:22000				2,90	2,90
DMSO 1:28600				2,50	2,50
DMSO 1:33000					
AERex <sup>1d</sup> 0,027m <sup>3</sup>	2,06	8,60	2,45		4,37
AERex <sup>1d</sup> 0,019m <sup>3</sup>	2,48	1,96	3,73		2,72
rBet v 1 2,3-0,05ng/ml	87,10	87,23	7,14		60,49
DMSO 1:22000 + rBet v 1	83,32	80,00	7,05		56,79
DMSO 1:28600 + rBet v 1	83,13	81,63	8,21		57,66
DMSO 1:33000 + rBet v 1	85,57	85,50	11,24		60,77
AERex <sup>1d</sup> 0,027m <sup>3</sup> + rBet v 1	82,04	80,25	4,04		55,44
AERex <sup>1d</sup> 0,019m <sup>3</sup> + rBet v 1	83,61	83,54	91,06		86,07
AERex <sup>1d</sup> 0,014m <sup>3</sup> + rBet v 1	97,11	79,01	6,54		60,89
AERex <sup>1d</sup> 0,009m <sup>3</sup> + rBet v 1	81,27	85,12	9,18		58,52

Tab.9: Patient III, Versuche mit AERex<sup>1d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Patient II*	Patient II*	Patient II*	Mittelwert*	S.D.*
Medium	3,18	6,50	0,96	3,73	
rBet v 1 0,23 – 0,5ng/ml	7,34	8,60	17,41	11,12	4,48
DMSO 1:6600 + rBet v 1			13,74	13,74	
DMSO 1:8800 + rBet v 1		10,21	12,66	11,44	
DMSO 1:11000 + rBet v 1		8,42	10,46	9,44	
DMSO 1:13200 + rBet v 1		10,23	12,15	11,19	
DMSO 1:15400 + rBet v 1		10,51	14,20	12,36	
DMSO 1:22000 + rBet v 1		8,20	10,92	9,56	
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup> + rBet v 1	10,70	13,97	16,19	13,62	2,25
AERex <sup>5d</sup> 0,094m <sup>3</sup> + rBet v 1		15,10	15,83	15,47	0,36
AERex <sup>5d</sup> 0,075m <sup>3</sup> + rBet v 1	18,10	16,11	17,57	17,26	0,84
AERex <sup>5d</sup> 0,062m <sup>3</sup> + rBet v 1		16,97	11,17	14,07	2,90
AERex <sup>5d</sup> 0,053m <sup>3</sup> + rBet v 1	8,59	16,71	15,64	13,65	3,60
AERex <sup>5d</sup> 0,037m <sup>3</sup> + rBet v 1	7,17	10,53	13,77	10,49	2,69

Tab.10: Patient II, Versuche mit AERex<sup>5d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].



Proben I.D.	Patient III*
Medium	1,98
rBet v 1 0,1ng/ml	48,38
DMSO 1:1100 + rBet v 1 0,1ng/ml	49,35
DMSO 1:2200 + rBet v 1 0,1ng/ml	45,47
DMSO 1:3300 + rBet v 1 0,1ng/ml	43,19
DMSO 1:4400 + rBet v 1 0,1ng/ml	40,96
AERex <sup>5d</sup> 0,755m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,1ng/ml	62,24
AERex <sup>5d</sup> 0,377m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,1ng/ml	48,54
AERex <sup>5d</sup> 0,251m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,1ng/ml	46,11
AERex <sup>5d</sup> 0,188m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,1ng/ml	50,51

Tab.11: Patient III, Versuche mit AERex<sup>5d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Patient IV*	Patient IV*	Mittelwert*
Medium			
	2,16	2,80	2,48
DMSO 1:6600		3,10	3,10
DMSO 1:8800		3,00	3,00
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup>		4,70	4,70
AERex <sup>5d</sup> 0,094m <sup>3</sup>		3,70	3,70
rBet v 1 2,3ng/ml	27,59		27,59
DMSO 1:2200 + rBet v 1 2,3ng/ml	33,57		33,57
DMSO 1:6600 + rBet v 1 2,3ng/ml	30,64		30,64
DMSO 1:8800 + rBet v 1 2,3ng/ml	27,62		27,62
DMSO 1:11000 + rBet v 1 2,3ng/ml	25,56		25,56
AERex <sup>5d</sup> 0,377m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3ng/ml	33,26		33,26
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3ng/ml	32,38		32,38
AERex <sup>5d</sup> 0,094m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3ng/ml	45,25		45,25
AERex <sup>5d</sup> 0,075m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3ng/ml	25,94		25,94

Tab.12: Patient IV, Versuche mit AERex<sup>5d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Patient V*	Patient V*	Mittelwert*
Medium	4,64	11,34	7,99
DMSO 1:6600		3,36	3,36
DMSO 1:8800		3,15	3,15
DMSO 1:13200		2,83	2,83
DMSO 1:15400		1,98	1,98
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup>		9,63	9,63
AERex <sup>5d</sup> 0,094m <sup>3</sup>		6,07	6,07
AERex <sup>5d</sup> 0,062m <sup>3</sup>		5,45	5,45
rBet v 1 0,23ng/ml	55,49	20,18	37,84
DMSO 1:6600 + rBet v 1 0,23ng/ml	54,74	21,19	37,97
DMSO 1:8800 + rBet v 1 0,23ng/ml	57,33	18,49	37,91
DMSO 1:13200 + rBet v 1 0,23ng/ml	53,48	14,03	33,76
DMSO 1:15400 + rBet v 1 0,23 ng/ml	50,13	17,08	33,61
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,23ng/ml	53,71	25,4	39,56
AERex <sup>5d</sup> 0,094m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,23 ng/ml	60,96	17,26	39,11
AERex <sup>5d</sup> 0,062m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,23ng/ml	67,98	18,14	43,06
AERex <sup>5d</sup> 0,053m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,23ng/ml	56,12	19,39	37,76

Tab.13: Patient V, Versuche mit AERex<sup>5d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Patient VI*
Medium	9,09
rBet v 1 0,2ng/ml	36,85
DMSO 1:3300 + rBet v 1 0,2ng/ml	32,72
DMSO 1:4400 + rBet v 1 0,2ng/ml	32,46
DMSO 1:5500 + rBet v 1 0,2ng/ml	34,59
DMSO 1:6600 + rBet v 1 0,2ng/ml	32,41
AERex <sup>5d</sup> 0,251m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,2ng/ml	40,36
AERex <sup>5d</sup> 0,188m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,2ng/ml	35,71
AERex <sup>5d</sup> 0,151m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,2ng/ml	51,91
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup> + rBet v 1 0,2ng/ml	34,94

Tab.14: Patient VI, Versuche mit AERex<sup>5d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].

Proben I.D.	Kontrolle					Mittelwert*	S.D*
	I*	II*	III*	IV*	V*		
Positiv-Kontrolle fMLP	28,25	29,26	16,14	54,20	18,70	29,31	15,06
Medium	2,55	6,28	3,03	2,65	0,60	3,02	2,05
DMSO 1:6600	2,62	3,64	2,16	2,79	0,49	2,34	1,16
DMSO 1:8800	2,2	3,3	3,81	2,67	0,69	2,53	1,20
DMSO 1:13200	2,55	1,87	2,26	2,07	0,00	1,75	1,01
DMSO 1:22000	2,02	3,2	2,21	1,52	1,33	2,06	0,73
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup>	3,28	7,76	4,05	3,40	2,08	4,11	2,16
AERex <sup>5d</sup> 0,094m <sup>3</sup>	3,06	11,2	4,6	3,33	0,62	4,56	3,98
AERex <sup>5d</sup> 0,062m <sup>3</sup>	3,74	4,97	4,17	2,05	0,88	3,16	1,66
AERex <sup>5d</sup> 0,037m <sup>3</sup>	2,93	4,61	4,1	1,73	0,47	2,77	1,70
rBet v 1 2,3ng/ml	3,34	8,1	2,89	2,81	0,74	3,58	2,72
DMSO 1:6600 + rBet v 1 2,3ng/ml	2,58	1,79	3,64	2,03	2,30	2,47	0,72
DMSO 1:8800 + rBet v 1 2,3ng/ml	1,8	1,67	1,27	1,08	1,76	1,52	0,32
DMSO 1:13200 + rBet v 1 2,3ng/ml	2,51	1,19	1,9	1,94	1,70	1,85	0,48
DMSO 1:22000 + rBet v 1 2,3ng/ml	1,81	1,41	2,05	1,75	1,96	1,80	0,25
AERex <sup>5d</sup> 0,125m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3ng/ml	3,12	4,93	4,11	2,65	1,11	3,18	1,46
AERex <sup>5d</sup> 0,094m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3ng/ml	3,12	5,72	2,33	2,67	0,24	2,82	1,96
AERex <sup>5d</sup> 0,062m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3 ng/ml	3,03	3	2,57	2,26	1,39	2,45	0,67
AERex <sup>5d</sup> 0,037m <sup>3</sup> + rBet v 1 2,3ng/ml	3,04	4,08	1,64	3,42	0,74	2,58	1,36

Tab.15: Kontrolle I-V, Versuche mit AERex<sup>5d</sup>, \* Aktivierung basophiler Granulozyten [%].