

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie

Einfluss polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe auf die
allergische Typ I - Reaktion:
Studien an basophilen Granulozyten von Birkenpollenallergikern

Stefanie Christina Lubitz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei) H. Parlar

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 06.05.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.08.2008 angenommen.

Diese Arbeit wurde am *Zentrum Allergie und Umwelt* der Technischen Universität München (Leitung: Prof. Dr. Heidrun Behrendt) in der Arbeitsgruppe Toxikologie und Expositionsforschung unter der Leitung von Prof. Dr. Jeroen Buters angefertigt. Prof. Dr. Wilfried Schwab betreute die Arbeit als Doktorvater.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit	III
III	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Allergische Erkrankungen	1
1.1.1	Historisches	1
1.1.2	Immunologische Grundlagen	2
1.1.3	Prävalenz allergischer Erkrankungen	4
1.1.4	Ost-West-Vergleichsstudien in Deutschland	5
1.1.5	Erklärungsmodelle für die Zunahme der Allergiekrankheiten	5
1.1.5.1	Genetische Prädisposition	6
1.1.5.2	Verbessertes medizinisches Wissen	7
1.1.5.3	Westernisierter Lebensstil („Western Life-Style“)	7
1.1.5.4	Passivrauch	8
1.1.5.5	„Hygiene“- oder „Urwald“- Hypothese.....	9
1.1.5.6	Luftverunreinigung	10
1.2	Dieseluß und Allergien	13
1.3	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	16
1.4	Das Birkenpollenallergen Bet v 1	19
1.5	Basophile Granulozyten	21
1.5.1	Allgemeines	21
1.5.2	Aktivierungsmarker	25
2	Ziel der Arbeit	27
3	Material und Methoden	29
3.1	Probanden	29
3.2	Chemikalien, Antikörper, Verbrauchsmaterial und Geräte	31
3.3	Medien, Puffer und Lösungen	37
3.4	Methoden	37
3.4.1	Pricktest	37
3.4.2	Messung des spezifischen IgE	38
3.4.3	Quantifizierung der Basophilenaktivierung	39
3.4.4	Durchflusszytometrische Messung	40
3.4.5	Isolierung humaner basophiler Granulozyten	42
3.4.6	Zellcharakterisierung	44
3.4.6.1	Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung	44
3.4.6.2	Hämatologische Färbemethoden	44
3.4.7	Stimulation der angereicherten basophilen Granulozyten	45
3.4.8	Charakterisierung von 9,10-Diacetoxy-Phenanthren und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	46
3.4.9	Antikörper-Array	49

3.4.10	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	50
3.4.10.1	Interleukin-4-ELISA	51
3.4.10.2	Interleukin-8-ELISA	51
3.4.10.3	Histamin-ELISA	51
3.4.10.4	Tryptase-Assay.....	52
3.4.11	Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten	53
3.4.12	Migrationsassay	53
3.4.13	DNA-Isolierung	54
3.4.14	Genotypisierung	54
3.4.14.1	<i>GSTP1</i> mittels Real-Time-PCR.....	54
3.4.14.2	<i>GSTM1</i> und <i>GSTT1</i> mittels PCR.....	57
3.4.15	Statistik	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Einfluss von PAKs auf die CD63-Expression auf basophilen Granulozyten ...	59
4.1.1	rBet v 1-induzierte CD63-Expression	59
4.1.2	Effekte des EPA-Standards auf die rBet v 1-induzierte CD63-Expression....	60
4.1.3	Nichtallergische Kontrollpersonen.....	62
4.1.4	Dosis-Wirkungsbeziehungen	63
4.2	Anreicherung humaner basophiler Granulozyten und Zellcharakterisierung .	64
4.3	Einfluss von Einzel-PAKs auf die Mediatorfreisetzung aus aufgereinigten Basophilen	67
4.3.1	Simultanbestimmung des Zytokin-Expressionsprofils mittels Antikörper-Array	67
4.3.2	Freisetzung von IL-4, IL-8, Histamin, Tryptase und IL-13 (ELISA)	70
4.3.2.1	Einfluss von Phenanthren und Benzo[a]pyren auf die Mediatorfreisetzung	70
4.3.2.2	Einfluss von 9,10-Diacetoxy-Phenanthren und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon auf die Mediatorfreisetzung	74
4.3.2.3	Einfluss von Phenanthren, Benzo[a]pyren, 9,10-Diacetoxy-Phenanthren und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon auf Basophile von Nichtallergikern	77
4.3.2.4	Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse	78
4.3.3	Migrationsassay	79
4.4	Einfluss der Glutathion-S-Transferasen T1, M1 und P1	80
4.4.1	Genotypisierung der Birkenpollenallergiker.....	80
4.4.2	Korrelation von PAK-induzierten Effekten auf die Mediatorfreisetzung von Basophilen und dem <i>GST</i> -Genotyp	80
5	Diskussion	82
6	Zusammenfassung	94
IV	Literaturverzeichnis	VII
V	Danksagung	XXVII
VI	Lebenslauf	XXIX
VII	Anhang	XXX

II Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit

Publikationen

Lubitz S., Schober W., Belloni B., Gebauer G., Eberlein B., Behrendt H., Buters J. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, phenanthrene and benzo[a]pyrene, drive allergic inflammation in human atopics by acting on basophils. *Submitted 2007*

Schober W., Lubitz S., Belloni B., Gebauer G., Lintelmann J., Matuschek G., Weichenmeier I., Eberlein-König B., Buters J., Behrendt H. Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance allergic inflammation by acting on human basophils. *Inhal Toxicol 2007; 19 Suppl 1:151-6*

Publizierte Abstracts

Lubitz S., Schober W., Belloni B., Eberlein-König B., Lintelmann J., Behrendt H., Buters J. Diesel soot-associated polycyclic aromatic hydrocarbons seem to be responsible for the rBet v 1-induced upregulation of CD63 in basophils from birch pollen allergic individuals. Poster auf dem XXV. EAACI Congress (European Academy of Allergology and Clinical Immunology), Wien, 11.-14. Juni 2006, Abstract Book, Abstract Nr. 228, page 76

Lubitz S., Schober W., Belloni B., Eberlein-König B., Behrendt H., Buters J. Organic extracts of urban aerosols, in particular PAHs, induce up-regulation of CD63 in human basophils. Poster auf dem XIX. World Allergy Organization Congress, 26. Juni bis 1. Juli 2005, München; Abstract Book, Abstract Nr. 1073, page 160

Lubitz S., Schober W., Belloni B., Eberlein-König B., Behrendt H., Buters J. Organic extracts of urban aerosols, in particular PAHs, induce an up-regulation of CD63 in human basophils. Vortrag auf dem 17. Mainzer Allergie Workshop, Mainz, 11.-12. März 2005; *Allergo J 2005; 1:29*

Lubitz S., Eberlein-König B., Papo C., Grimm W., Ring J., Behrendt H., Buters J.T. Are xenobiotica metabolizing enzymes involved in the etiology of the Multiple Chemical Sensitivity (MCS) syndrome? Poster auf dem XXIII. EAACI Congress (European Academy of Allergology and Clinical Immunology), Amsterdam, 12.-16. Juni 2004; Abstract Book, Abstract Nr. 574, page 174

Lubitz S., Eberlein-König B., Grimm V., Behrendt H., Buters J.T. Role for xenobiotic metabolism in the Multiple Chemical Sensitivity (MCS) syndrome? Vortrag auf dem 16. Mainzer Allergie Workshop, Mainz, 12.-13. März 2004; *Allergo J 2004; 1:31*

Preise

JMA Poster Prize der *European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)*, 8th JMA poster session, XXV Congress of the EAACI, 11. Juni 2006, Wien

Poster Prize in the Poster Group "Environment-Immune System Interactions" der *European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)*, XXV Congress of the EAACI, 12. Juni 2006, Wien

III Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Abb.	Abbildung
aqua dest.	destilliertes Wasser
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[a]P-Chinon	1,6-Benzo[a]pyren-Chinon
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
DEP	diesel exhaust particles
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
entspr.	entspricht
EPA	Environmental Protection Agency
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FBS	fetal bovine serum
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fMLP	N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FRET	fluoreszenz resonanz energie transfer
FSC	forward scatter
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
gp53	Glykoprotein 53 (CD63)
GSTM1	Glutathion-S-Transferase M1
GSTP1	Glutathion-S-Transferase P1
GSTT1	Glutathion-S-Transferase T1
HPLC-MS	high performance liquid chromatography - mass spectrometry
HRP	horse radish peroxidase
ICAM-1	intracellular adhesion molecule
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
I	Isoleucin
kDa	Kilo-Dalton
LAN	linker-arm-nucleotide
lat.	lateinisch
LTB ₄	Leukotrien B ₄

M	molar
MACS	magnetic cell separation
MCP-3	monocyte chemoattractant protein-3
Mg	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
min.	Minute(n)
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein-1-alpha
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA (Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
ng	Nanogramm
n.s.	nicht signifikant
°C	Grad Celsius
PAK	polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PBMC	peripher blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Phe	Phenanthren
Phe-HyChinon	9,10-Phenanthren-Hydrochinon
PI	Propidiumiodid
PM	particulate matter
ppm	parts per million
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
rBet v 1	rekombinantes Betula verrucosa 1
ROS	reactive oxygen species
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
sek.	Sekunde(n)
slgE	spezifisches Immunglobulin E
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	side scatter
StabW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T _H 1	T-Helferzelle vom Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle vom Typ 2
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TPO	Thrombopoietin
TSP	total suspended particulates
u.a.	unter anderem
UFP	ultrafine particles
v.a.	vor allem

V	Valin
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule - 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIC	6-Carboxy-Rhodamin
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

1 Einleitung

1.1 Allergische Erkrankungen

1.1.1 Historisches

Bereits 1819 wurde Heuschnupfen von John Bostock als eine außergewöhnliche Reaktion auf äußere Stimuli beschrieben, die er damals „Catarrhus aestivus“ (lat.: Sommerkatarrh) nannte (27). Die moderne Allergieforschung begann Ende des 19. Jahrhunderts mit den brillianten Schlussfolgerungen des Arztes Charles Harrison Blackley aus Manchester, der in Selbstversuchen den Zusammenhang zwischen der Exposition mit Gräserpollen und dem Auftreten allergischer Symptome nachwies (23). 1906 wurde eine zuerst als „Serum Krankheit“ (228) bezeichnete Reaktion unter dem Begriff „Allergie“ durch den Kinderarzt Clemens von Pirquet in einem Artikel der Münchener Medizinischen Wochenschrift in die medizinische Terminologie eingeführt (227). Die französischen Wissenschaftler Charles Richet und Paul Portier stellten Anfang des 20. Jahrhunderts Untersuchungen mit Quallengift an und schufen den Begriff der „Anaphylaxie“ (166, 170). Im Jahr 1913 wurde Paul Portier für seine Studien über Anaphylaxie mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (170, 146). Auf Coca und Cooke schließlich geht ein Vorschlag zur Klassifizierung allergischer Erkrankungen und der Term „Atopie“ zurück, den sie 1923 als Überbegriff vorschlugen, nachdem ihnen klar geworden war, dass Asthma und Heuschnupfen ähnliche pathogene Formen aufweisen (42). Heute definiert man Atopie als „familiär auftretende Neigung zur Entwicklung bestimmter Krankheiten (allergisches Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis, atopisches Ekzem) auf dem Boden einer immunologischen Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten gegen Umweltstoffe, assoziiert mit vermehrter IgE-Produktion und/oder veränderter unspezifischer Reaktivität“. Unter Allergie versteht man eine „verstärkte, spezifische Abwehrreaktion gegenüber an sich harmlosen Substanzen im Sinne einer krank machenden Überempfindlichkeit“ (177).

1.1.2 Immunologische Grundlagen

Die Entwicklung einer Allergie erfolgt nach klinisch stummem Erstkontakt mit einem harmlosen Antigen in der sogenannten Sensibilisierungsphase. Bei erneutem Kontakt mit dem Antigen kommt es in verschiedenen Organsystemen zu Entzündungsreaktionen. Besonders häufig betroffen sind Haut, Konjunktiven, der Nasen- und Rachenraum und die Bronchialschleimhaut. Die Symptome sind variabel. Sie reichen von allergischer Rhinokonjunktivitis über allergisches Asthma bis hin zur Anaphylaxie. Als Allergene bezeichnet man Antigene, die eine allergische Immunantwort auslösen können (168). Im Jahre 1963 wurden die allergischen Reaktionen von Coombs and Gell in 4 Typen eingeteilt (44). Typ I bis III werden durch Antikörper vermittelt. Sie unterscheiden sich aufgrund der beteiligten Antigene und der Antikörperklassen. Überempfindlichkeitsreaktionen vom Typ I (auch „Allergien vom Soforttyp“ genannt) sind Gegenstand dieser Arbeit. Sie werden durch Immunglobulin Klasse E (IgE) vermittelt und führen innerhalb von Sekunden oder Minuten zu klinischen Symptomen. Zu Reaktionen des Typs I kommt es, wenn bereits vorhandene IgE-Antikörper, die an den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) gebunden sind, durch die Bindung an ein Allergen quervernetzen und mindestens zwei zellständige IgE-Antikörper überbrücken. Der Fcε-Rezeptor findet sich auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Der entstandene Allergen-Antikörper-Komplex löst eine Signalkaskade aus, die zur Degranulation und Mediatorfreisetzung aus beiden Zelltypen führt. Es werden präformierte Substanzen freigesetzt (z.B. das biogene Amin Histamin, Proteoglykane wie Heparin und viele mehr), und andere Mediatoren neu gebildet (z.B. Leukotriene, Prostaglandine, Zytokine). Diese lösen in der Frühreaktion im angrenzenden Gewebe eine allergische Entzündungsreaktion mit klinischen Symptomen wie Asthma bronchiale und Rhinokonjunktivitis aus. Schwere allergische Reaktionen können zum anaphylaktischen Schock führen, der lebensbedrohlich sein kann. In der Spätphase der allergischen Reaktion werden z.B. Leukotriene freigesetzt, die ebenfalls eine Entzündungsreaktion zur Folge haben und zur Chronifizierung atopischer Erkrankungen beitragen (151).

Auf zellulärer Ebene geht diesen Reaktionen eine Deregulation der T_H1/T_H2 -Immunantwort voraus. Allergene werden nach dem Überwinden der Epithelbarriere

von antigenpräsentierenden Zellen (vor allem dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) den T-Zellen in Form von Peptidfragmenten auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC II) präsentiert. Somit wird das Antigen von T_H1 -oder T_H2 -Zellen erkannt. Diese schütten Zytokine aus und aktivieren dadurch B-Lymphozyten. Interleukin-12 (IL-12) fungiert als wichtigstes regulatorisches Zytokin der T_H1 -Antwort und hemmt T_H2 -Zellen, während die T_H2 -Antwort durch IL-4 gefördert wird. Beim Allergiker findet auf dieser Ebene eine Fehlregulierung statt, die zu einer übermäßigen pathologischen T_H2 -Antwortbereitschaft führt. T_H2 -Zellen produzieren vermehrt IL-4 und bewirken somit die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu IgE-produzierenden Plasmazellen. Das gebildete IgE bindet an den hochaffinen IgE-Rezeptor. Durch die Bildung eines stabilen Komplexes bei erneutem Allergenkontakt in der sogenannten Effektorphase wird ein Signal ausgelöst, welches wie oben beschrieben zur Aktivierung der Zelle und zur Degranulation führt.

Die Typen II und III werden durch IgG vermittelt, welches entweder komplementvermittelte oder phagozytische Effektormechanismen auslöst. Reaktionen des Typs II führen durch Zytolyse körpereigener Zellen zu zellspezifischen Gewebeschäden, bei der Typ III-Reaktion kommt es durch Immunkomplexe zur lokalen Schädigung des betroffenen Gewebes. Reaktionen vom Typ IV, auch „verzögerter Typ“ genannt, sind T-Zell-vermittelt. Die Schädigung beruht hier entweder auf der Aktivierung von Makrophagen durch T_H1 -Zellen oder auf direkter Reaktion zytotoxischer T-Zellen (Abb.1). Ein klassisches Beispiel für die Typ IV-Reaktion ist die allergische Kontaktdermatitis (100, 130, 176).

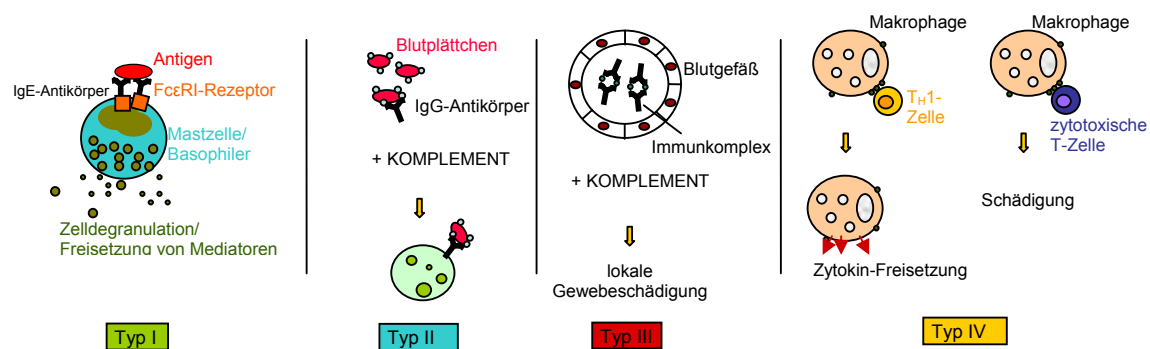


Abb.1: Klassifikation der allergischen Immunantwort in 4 Typen (nach 100, verändert)

Die Definition von Coombs and Gell wurde später noch durch die Typen V und VI erweitert. Als Allergien vom Typ V sind granulomatöse Reaktionen definiert, die sich

histologisch durch Epitheloidzellgranulome auszeichnen. Als Typ VI wurde eine krank machende Immunreaktion beschrieben, die durch spezifische Antikörperwirkung zustande kommt (176).

1.1.3 Prävalenz allergischer Erkrankungen

Die Prävalenz allergischer Erkrankungen hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen (174, 180, 243). Der stärkste Anstieg fand in den Jahren 1960 bis 1990 in den westlichen Ländern statt (239). Allergische Erkrankungen sind häufig mit einem hohen Leidensdruck der betroffenen Patienten verbunden und verursachen zudem durch ärztliche Behandlung und verminderte Leistungsfähigkeit beträchtliche volkswirtschaftliche Kosten. Sie gehören somit zu einer der großen medizinischen Herausforderungen unserer Zeit (177, 200, 66).

Die Zunahme von Allergiekrankheiten wird durch epidemiologische Studien in zahlreichen Ländern bestätigt. In der Schweiz stieg die Zahl der an Heuschnupfen Erkrankten von 0,8 % 1926 auf 14,2 % 1991 (244). Die allergische Rhinitis in Schweden nahm von 1971 bis 1981 innerhalb von 10 Jahren von 4,4 auf 8,8 % zu (1), und aus Schottland wird von einem Anstieg der allergischen Rhinitis bei Schulkindern zwischen 8 und 13 Jahren von 3,2 auf 11,9 % von 1964 bis 1989 berichtet (154). Hohe Prävalenzraten für allergische Erkrankungen finden sich heute auch in anderen Ländern der Welt, was in einem internationalen Vergleich für Kinder in der Studie „International Study of Asthma and Allergy in Childhood“ (ISAAC) und für Erwachsene in der Studie „European Community Respiratory Health Survey in Adults“ (ECRHS) gezeigt werden konnte (37, 87, 242). Während die höchsten Raten für die Rhinokonjunktivitis bei Kindern breit verteilt lagen, wurden die höchsten Asthma-Prävalenzen für Kinder im Alter von 13-14 Jahren in Großbritannien, Neuseeland, Australien, Irland und einigen Zentren in den USA gefunden, also ausschließlich in Ländern mit „westlichem Lebensstil“. Die Prävalenz von Asthma bei deutschen Kindern im Alter von 13-14 Jahren, gemessen in den Städten Greifswald und Münster, lag mit 15 % im internationalen Vergleich ebenfalls im oberen Bereich. Beim Heuschnupfen und beim atopischen Ekzem nahmen deutsche Kinder mit Prävalenzen von 13 % und 7 % einen Platz im Mittelfeld ein (242). Auch bei den 20-44-jährigen Erwachsenen lagen die Prävalenzen für Asthma und allergische Rhinitis in einem mittleren Bereich, verglichen mit den anderen europäischen Ländern, wobei

die ermittelten Werte in den beiden deutschen Studienzentren Hamburg und Erfurt deutlich unterschiedlich waren. Die Häufigkeit des Auftretens der allergischen Rhinitis beispielsweise lag in Hamburg bei 23 %, in Erfurt bei 13 %. Die höchsten Raten für Asthma und allergische Rhinokonjunktivitis waren auch bei Erwachsenen in Australien, Neuseeland und Großbritannien und Frankreich zu finden (87).

1.1.4 Ost-West-Vergleichsstudien in Deutschland

Nach dem Mauerfall 1989 ergab sich in Deutschland eine einmalige Chance: Ein Kollektiv von vielen Millionen Menschen, die genetisch und sprachlich weitgehend gleich und unter gleichen klimatischen Bedingungen über 40 Jahre isoliert voneinander unter unterschiedlichen Umweltbedingungen gelebt hatten, konnte hinsichtlich seiner allergischen Erkrankungen epidemiologisch untersucht werden (179). In Vergleichsstudien mit Kindern aus München und Leipzig zur Prävalenz asthmatischer und anderer allergischer Erkrankungen wurde bei Kindern in München häufiger allergische Rhinokonjunktivitis und allergisches Asthma diagnostiziert, während die Leipziger Kinder öfter unter Bronchitis litten (224). Weitere epidemiologische Studien ergaben übereinstimmend niedrigere Raten für die Prävalenz inhalativer allergischer Erkrankungen und allergischer Sensibilisierungen in den neuen Bundesländern, während allergische Hauterkrankungen und Infektionserkrankungen der oberen Atemwege in Ostdeutschland vermehrt auftraten (12, 18, 86, 189, 200). Studien mit Kindern aus Dresden, Leipzig und München aus den Jahren 1995 und 1996 zeigen, dass ostdeutsche Kinder immer noch weniger an asthmatischen Erkrankungen leiden als westdeutsche. Für die Prävalenzen für Heuschnupfen allerdings fanden sich keine Unterschiede mehr zwischen München und Dresden (226, 235).

1.1.5 Erklärungsmodelle für die Zunahme der Allergiekrankheiten

Die Allergenträger der Außen- und Innenraumluft sind, neben genetischer Prädisposition, die wichtigsten Faktoren für die Entstehung (Sensibilisierung), Auslösung und Unterhaltung (Chronifizierung) einer allergischen Erkrankung. Darüber hinaus können Stoffe und Stoffgemische aus der Umwelt, die selbst nicht

allergen sind, die Allergieentstehung fördern (Adjuvans-Effekte) und zur Chronifizierung beitragen (133, 200; Abb.2).

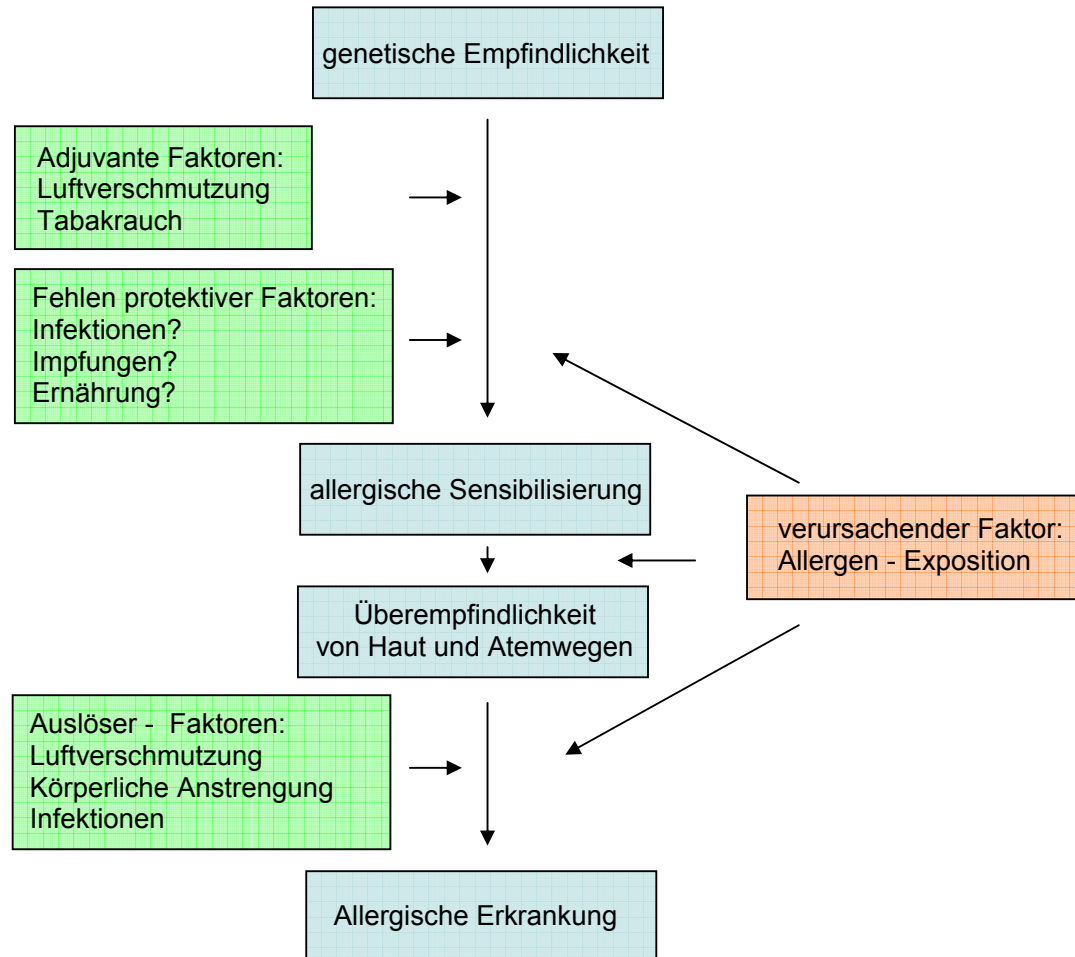


Abb.2: Determinanten allergischer Erkrankungen (nach 178, 200)

Es existieren mehrere, oft kontrovers diskutierte Modelle für die Allergiezunahme (174), die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

1.1.5.1 Genetische Prädisposition

Eine genetische Prädisposition ist häufig bei Allergikern zu beobachten. Der Begriff *Atopie* von Coca und Cooke 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. Die Krankheit wird polygen vererbt. 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%, falls beide Eltern unterschiedliche Manifestationen zeigen, bis hin zu 60-80%, wenn beide Eltern dieselbe Manifestation aufweisen (176).

Das alleine ist allerdings keine ausreichende Erklärung für den Anstieg der Allergiekrankheiten. In den bereits angesprochenen Ost-West-Vergleichsstudien in Deutschland nach der Wiedervereinigung wurden große Unterschiede zwischen zwei Populationen gefunden, die sich vom genetischen Hintergrund her kaum unterschieden (190).

1.1.5.2 Verbessertes medizinisches Wissen

Eine Verbesserung der ärztlichen Diagnose-Möglichkeiten zum einen und ein verändertes Gesundheitsbewusstsein in der Bevölkerung zum anderen haben die Allergiezahlen statistisch erhöht. Studien allerdings, die nur darauf angelegt waren, mit gleichen Methoden eine Allergie nachzuweisen wie früher, zeigen, dass nicht alleine das verbesserte Wissen um die allergische Entzündungsreaktion für die erhöhte Allergieprävalenz verantwortlich sein kann (92, 180, 188). Außerdem spricht die drastische Zunahme der Heuschnupfenprävalenzen in Ostdeutschland innerhalb weniger Jahre nach der Wende für den Einfluss anderer Faktoren (226, 235).

1.1.5.3 Westlicher Lebensstil („Western Life-Style“)

Der Lebensstandard in den Industriestaaten hat sich im letzten Jahrhundert deutlich verändert. Als mögliche Faktoren, die im Zusammenhang mit der Zunahme der Allergierkrankungen eine Rolle spielen könnten, werden unter anderem diskutiert:

Sozioökonomische Faktoren: Eine Abnahme der Familiengröße bzw. der Personen, die in einem Haushalt leben, wird mit der Zunahme atopischer Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Außerdem scheint eine bessere Ausbildung der Eltern, welche einhergeht mit einem Anstieg des Alters der Mutter bei

ihrem ersten Kind, mit der Sensibilisierung der Kinder zu korrelieren (17, 21, 91, 125, 174, 225).

Lebens- und Wohnbedingungen: Ein verändertes Freizeitverhalten durch mehr Fernsehen und Computerspiele bedeutet außerdem einen vermehrten Aufenthalt in Innenräumen. Tapeten und Teppiche werden als allergiefördernd angesehen, und auch die verbesserte Isolation von Wohnungen führt zu einer erhöhten Exposition gegenüber Hausstaubmilben (164). Krämer *et al.* fanden eine positive Korrelation von atopischem Ekzem und einer vermehrten Belastung der Wohnung mit Hausstaubmilben bei genetisch vorbelasteten Kindern (Kinder mit Eltern, bei denen eine atopische Erkrankung diagnostiziert wurde) (128). Ebenso erhöht die gestiegene Zahl an Haustieren in den Wohnungen die Allergenlast (147).

Lebensmittel: Veränderte Ernährungsgewohnheiten haben eine Vielzahl neuer potenzieller Allergene zur Folge: der Trend geht hin zu exotischen Früchten und Gewürzen und zum Einsatz einer Vielzahl von Lebensmittelzusatzstoffen in Fertiggerichten und „Fast food“ (174, 203). Besonders für Menschen, die bereits sensibilisiert sind, bedeutet dies ein ständiges Risiko, Symptome gegen neue Allergene zu entwickeln (203).

1.1.5.4 Passivrauch

In tierexperimentellen Studien an Mäusen und Ratten konnte gezeigt werden, dass Tabakrauch eine erhöhte IL-4-Synthese induziert und die Bildung von IgE-Antikörpern erhöht (197, 247). Kinder, die gegenüber Tabakrauch exponiert waren, zeigten ebenfalls erhöhte Level an IgE und IL-4 im Serum. Außerdem fand sich eine verstärkte Neigung zu Atemwegserkrankungen (67, 106). Bereits in der Schwangerschaft bewirkte Passivrauch ein erhöhtes Risiko für eine allergische Sensibilisierung und obstruktive Atemwegserkrankungen (84). Da allerdings unterschiedlich starker Tabakgenuss zwischen verschiedenen sozioökonomischen oder geographischen Gruppen nicht mit den Unterschieden in der Allergieprävalenz einherging, ist es unwahrscheinlich, dass der Tabakrauch trotz der gezeigten Effekte auf allergische Erkrankungen einen Hauptgrund für die weltweit steigenden Zahlen darstellt (203).

1.1.5.5 „Hygiene“- oder „Urwald“- Hypothese

Das Immunsystem der Menschen in westlichen Industrienationen ist heutzutage weniger als früher gefordert, Krankheiten viraler, bakterieller, mykotischer oder parasitärer Natur zu bekämpfen (174). Abwehrmechanismen beispielsweise gegen Parasiten, die über IgE-Antikörper verlaufen, sind aber immer noch vorhanden und könnten nun gegen an sich harmlose Substanzen wie Pollen zum Einsatz kommen (181, 205). In Bevölkerungsgruppen mit einem hohen Anteil an Parasitenbefall zeigten sich erhöhte IgE-Level bei gleichzeitig niedrigen Prävalenz-Raten für Asthma und Heuschnupfen (175). Kinder in Ostdeutschland nach der Wende zeigten erhöhte IgE-Spiegel und gleichzeitig einen vermehrten Befall an Parasiten (19, 179). Ähnliches zeigen Studien aus Ecuador (131).

In zahlreichen epidemiologischen Studien, die ländliche mit städtischen Gebieten vergleichen, konnte gezeigt werden, dass Allergieerkrankungen in den Städten vermehrt auftraten. Untersuchungen aus der Schweiz, aus Finnland, Deutschland und Australien machten deutlich, dass Kinder auf Bauernhöfen, die viel mit Tieren in Kontakt kamen und stark gegen Endotoxine exponiert waren, ein geringeres Allergierisiko hatten als Kinder aus den gleichen Gebieten, die nicht auf Bauernhöfen lebten (29, 76, 132, 173). Dabei scheint sowohl der Kontakt mit Tieren als auch der Genuss von Rohmilch eine Rolle zu spielen (232, 233). Die T_H1 -Antwort des Immunsystems auf die mikrobielle Belastung durch Farmtiere wird für diese Effekte verantwortlich gemacht (28, 95). Dies könnte auch bedeuten, dass Kinder, die häufiger unter Infektionskrankheiten leiden, ein geringeres Allergierisiko haben. Bei Infektionskrankheiten erfolgt ebenfalls eine T_H1 -Antwort, die eine T_H2 -Antwort auf harmlose Proteine verdrängen könnte. In diesem Zusammenhang konnte von Krämer *et al.* an Kindern aus kleinen Familien (bis zu 3 Personen) gezeigt werden, dass sie ein umso geringeres Allergierisiko hatten, je früher sie in Kinderkrippen gegeben wurden (126). In zahlreichen anderen Studien konnten weitere „Allergieprotektive“-Faktoren gefunden werden: Eine geringere Rate an gastrointestinalen Infektionen fand sich beispielsweise bei allergischen Männern in einer italienischen Studie (145). Bei zweijährigen Kindern aus Schweden und Estland wurden in der Darmflora allergischer Kinder eine geringere Menge an Laktobazillen gefunden (22). Nicht erklärt durch die Hygiene-Hypothese wird aber beispielsweise die hohe

Allergieprävalenz in sehr armen Gebieten in Entwicklungsländern und Slums (153, 174).

Die Interaktionen zwischen Mikroorganismen, Infektionen und der Entwicklung von Allergierkrankheiten scheinen insgesamt gesehen sehr komplex zu sein. Die Zusammenhänge und der mögliche medizinische Nutzen, den man aus den gewonnenen Erkenntnissen ziehen könnte, sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

1.1.5.6 Luftverunreinigung

Um die Wirkung verschiedener Komponenten der anthropogenen Luftverschmutzung darzustellen, muss diese zunächst in zwei Typen eingeteilt werden: Typ-I-Luftschadstoffe sind primäre Schadstoffe wie Schwefeldioxid (SO₂) und große Staubpartikel, die als solche in die Atmosphäre emittiert werden. Unter Typ-II-Luftschadstoffen versteht man primäre und sekundäre Substanzen wie Ozon, Stickoxide, flüchtige organische Substanzen (volatile organic compounds, VOCs) und kleine Partikel mit einem aerodynamischen Durchmesser von kleiner als 2,5 µm (20). Typ-I-Luftschadstoffe führen zu irritativen und entzündlichen Erkrankungen der oberen Atemwege. Die durch SO₂ hervorgerufene Exacerbation des Asthmas wird normalerweise durch die bronchokonstriktorische Wirkung und weniger durch entzündliche Vorgänge hervorgerufen (200). Behrendt stellte 1992 mit dem Prinzip der „Allergotoxikologie“ ein Konzept zur Aufklärung möglicher Zusammenhänge zwischen Schadstoffbelastung und Allergierkrankungen vor, welches einen interdisziplinären Ansatz zwischen epidemiologischen Untersuchungen, experimentellen Ansätzen und klinischen Studien darstellt (11). Eine Assoziation von Typ-I-Schadstoffen mit allergischen Erkrankungen wurde bisher nicht gezeigt (177). Im Gegensatz dazu konnte in zahlreichen Studien demonstriert werden, dass eine Belastung mit Typ-II-Luftschadstoffen mit einer erhöhten Prävalenz an Allergierkrankungen einhergeht (16, 88, 127, 222). Beispielsweise verursacht Ozon bei gesunden Personen vorübergehende Lungenfunktionsstörungen, die durch körperliche Belastung verstärkt werden. In Studien führten 0,1 bis 0,4 ppm Ozon bereits zu einer Entzündung der Atemwege, die durch den Einstrom neutrophiler Granulozyten und den Anstieg entzündungsfördernder Zytokine gekennzeichnet ist. Bei Allergikern ist die ozonabhängige entzündliche Reaktion zusätzlich durch einen

Anstieg von eosinophilen Granulozyten bestimmt, also von Zellen, die eine zentrale Rolle in der allergischen Immunantwort spielen (8, 200).

Partikel in der Luft setzen sich aus natürlichen (marine Aerosole, geogene Mineralstäube, Bioaerosole, Pollen, Sporen u.a.) und anthropogenen Bestandteilen zusammen und werden aufgrund ihrer Größe unterschieden.

Ein großer Teil der partikulären Luftinhaltsstoffe ist anthropogener Herkunft, wobei die Partikelemission in der Regel in engem Zusammenhang mit der Verbrennung fossiler Brennstoffe steht. Wesentlich im Außenluftbereich sind vor allem verkehrsbedingte Emissionen, aber auch die Luftverschmutzung durch die Feuerungsanlagen der privaten Haushalte sowie der Industrie spielen eine große Rolle (Abb.3).

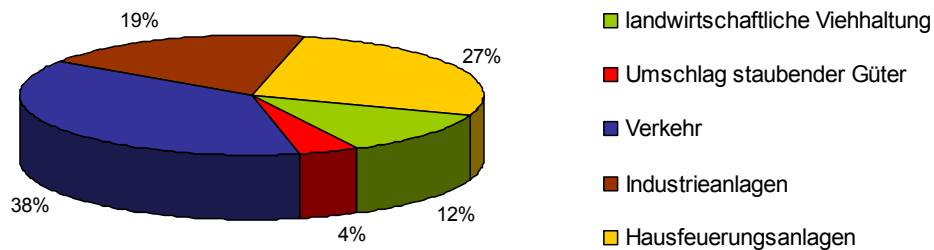


Abb.3: PM₁₀-Emissionen in Bayern im Jahr 2000 (Quelle: Emissionskataster Bayern, Bayerisches Landesamt für Umwelt 2004)

Die gesundheitlichen Auswirkungen der einzelnen Partikelfractionen sind von ihrer räumlichen Deposition im Atemtrakt abhängig. Während grobe Partikel rasch sedimentieren, werden Partikel zwischen 10 und 5 µm aerodynamischer in den oberen Luftwegen deponiert. Partikel bis 5 µm sind bei Mundatmung alveolengängig, bei Nasenatmung gelangen Partikel bis 1 µm in die Alveolen (200).

Aufgrund ihres Durchmessers klassifiziert man Partikel folgendermaßen (Tab.1):

Klassifikation	Abkürzung	Durchmesser
Gesamtschwebstaub, total suspended particulates	TSP	< 15 µm
Inhalierbarer Schwebstaub, Feinstaub	PM ₁₀	< 10 µm
Lungengängiger Schwebstaub	PM _{2,5}	< 2,5 µm
Ultrafeine Partikel, ultrafine particles	UFP, PM _{0,1}	< 0,1 µm

Tab.1: Klassifizierung von Aerosolpartikeln gemäß ihrer Teilchengröße (77)

Die jährlichen Staubemissionen in Deutschland sind rückläufig. In den alten Bundesländern war dieser Trend schon vor 1990 zu bemerken und war insbesondere der verminderten Staubabscheidung in den Großanlagen von Kraftwerken und Industrie sowie der Umstellung von festen auf emissionsärmere, flüssige und gasförmige Brennstoffe zu verdanken. In den neuen Bundesländern konnte seit 1990 ein ähnlicher Trend beobachtet werden, u.a. durch die Stilllegung veralteter Feuerungs- und Industrieanlagen oder durch verbesserte Wirksamkeit von Entstaubungsanlagen (Quelle: Umweltbundesamt).

Der Anteil von PM₁₀ am Gesamtstaub lag im Jahre 2002 bei 64,4%, wobei auch hier ein Rückgang im Vergleich zum Jahre 2000 zu verzeichnen ist (65,7%). In einer Untersuchung in Erfurt konnte aber gezeigt werden, dass der Anteil an ultrafeinen Partikeln mit einem Durchmesser von < 0,03 µm im Verhältnis zu anderen Partikeln gestiegen ist (240).

Trotz der verbesserten lufthygienischen Verhältnisse, insbesondere der Reduktion der PM₁₀-Fraktion, wurden seit Mitte der 80er Jahre vermehrt Studien veröffentlicht, die Hinweise auf adverse Gesundheitseffekte der Luftschadstoffe in der Bevölkerung dokumentieren und diese zu einem großen Teil auf die inhalierbare Fraktion des Schwebstaubes zurückführen (7, 31, 56).

In einer Reihe von epidemiologischen Untersuchungen sind Zusammenhänge zwischen Verkehrsbelastung und allergischen Reaktionen dargestellt. In einer japanischen Studie konnte eine höhere Prävalenz für Sensibilisierungen gegen Zedernpollenallergene bei Personen in stark verkehrsbelasteten Gebieten gezeigt werden als bei Personen, die in wenig belasteten, ländlichen Gebieten lebten (97). Weitere Untersuchungen berichten über einen Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und allergischen Erkrankungen bzw. allergischer Symptomatik bei Kindern. Vier Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen verkehrsbedingten Immissionen und dem Symptom Wheezing (pfeifende, fiepende Atemgeräusche) (58, 158, 160, 234). Zwei dieser Studien aus Münster und Bonn berichten über einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Lastwagenverkehr in der Wohnstraße und Symptomen einer allergischen Rhinitis (58, 234). In drei Studien wird eine Assoziation mit Asthma beschrieben (63, 204, 222). Drei weitere Untersuchungen konnten keinen Zusammenhang zwischen der

Straßenverkehrsbelastung und den Prävalenzen von Heuschnupfen und Asthma feststellen (143, 229, 241). Untersuchungen an 317 Schulkindern in Düsseldorf belegten eine mit zunehmender Verkehrsbelastung in innerstädtischen Arealen ansteigende Häufigkeit von Pollensensibilisierungen und eine überproportionale Ausprägung der Symptome (127, 200). Diese Erkenntnisse geben auch einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Allergieprävalenzen in West- und Ostdeutschland nach der Wende: Während in den osteuropäischen Ländern die Typ-I-Luftverschmutzung vorherrschend war, für die keine Assoziation mit allergischen Erkrankungen gefunden wurde, bestimmten die „moderneren“ Typ-II-Schadstoffe das Bild in den westlichen Ländern (178).

1.2 Dieselruß und Allergien

38 % der PM_{10} -Emissionen werden durch den Verkehr verursacht (siehe Abb.3). Von diesen 38 % fallen knapp 30 % auf Diesel-Offroad-Kfz (landwirtschaftliche Nutzfahrzeuge und Baustellenfahrzeuge) und 63 % auf den Straßenverkehr, wobei hier der Anteil an Emissionen aus dieselbetriebenen PKW und Nutzfahrzeugen bei fast 70 % liegt (Quelle: Emissionskataster Bayern, Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2004). Ein Dieselmotor emittiert etwa 100mal so viele Rußpartikel wie ein Benzinmotor. Dieselruß bezeichnet hierbei die Gesamtpartikelmasse von Dieselmotoremissionen. Mehr als 85 % der emittierten Partikel haben einen Durchmesser von $< 0,1 \mu m$ und gehören somit der ultrafeinen Fraktion an. An der Luft lagern sie sich zu größeren Agglomeraten ($< 2,5 \mu m$) zusammen. Dieselrußpartikel sind vollständig alveolengängig und werden dort stärker deponiert als im Tracheobronchialraum (89, 132).

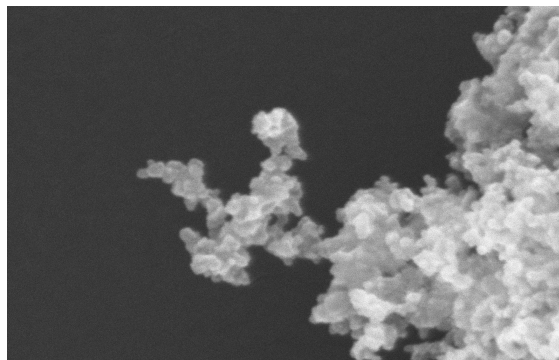


Abb.4: Dieselrußpartikel-Agglomerate
(Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme:
I.Weichenmeier, Zentrum Allergie und Umwelt)

Dieserußpartikel (DEP) bestehen aus einem Kern aus elementarem Kohlenstoff, an den anorganische und organische Bestandteile gebunden sind (Abb.5). Die adsorbierten organischen Bestandteile sind Produkte unvollständiger Verbrennungsprozesse und beinhalten u.a. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs), redoxaktive PAK-Chinone (94), Nitroaromaten, Heterozyklen, Chinone und Aldehyde. Der PAK-Gehalt liegt je nach Dieselmotortyp bei etwa 1-1,5 µg PAK pro mg Partikel. Die in den Dieselmotoremissionen vorkommenden PAKs bestehen ca. zur Hälfte aus Phenanthren und dessen Derivaten. Weitere quantitativ bedeutsame Vertreter sind Fluoren, Naphthalen, Fluoranthen und Pyrene (einschließlich Benzo[a]pyren), die insgesamt 10-15 % der PAKs ausmachen. (133, 152).

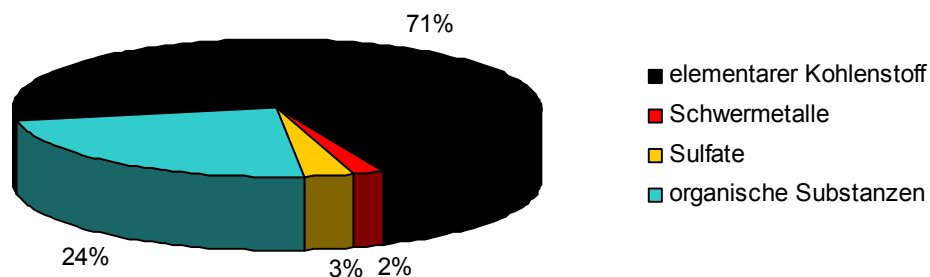


Abb.5: Zusammensetzung von Dieselrußpartikeln (nach 133)

Dieseruß wird mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkte in Verbindung gebracht (162). Er ist im Tierversuch kanzerogen, und auch für beruflich stark exponierte Personen konnte eine Erhöhung des Lungenkrebsrisikos nachgewiesen werden (32). Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) stufte Dieselmotor-Emissionen als krebserzeugend Kategorie 2 ein, und damit „als krebserzeugend für den Menschen anzusehen“ (Quelle: Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG).

Aus *in vitro*- und tierexperimentellen Studien geht hervor, dass Dieselrußpartikel bei IgE-abhängigen allergischen Prozessen die IgE-Antwort erhöhen. Die Effekte auf die IgE-Bildung waren unabhängig von der Applikationsart (intraperitoneal, intranasal, intratracheal, inhalativ) und konnten auch mit organischen Extrakten aus Dieselruß beobachtet werden (75, 150). Zahlreiche Befunde zeigen darüber hinaus, dass die Dieselruß-induzierte Erhöhung der antigenspezifischen IgE-Antwort im Tierversuch mit der vermehrten Produktion von IL-4 (in Milz und Lymphknoten), IL-5 (in

Lungenzellen), IL-10 (in der Milz), GM-CSF und IL-13 (in der Lunge) einhergeht und somit verstärkt ein T_H2-typisches Zytokinmuster (IL-4, IL-5 und IL-13) exprimiert wird (74, 75, 209, 246). Symptome der histamininduzierten Rhinitis wurden durch die adjuvante Wirkung von Dieselrußpartikeln im Meerschweinchen verstärkt (123).

Humanstudien werden erschwert durch die bekannten kanzerogenen und mutagenen Eigenschaften von Dieselruß (133, 159). PBMCs von allergischen Probanden zeigten synergistische Effekte in Kokultur mit organischen Extrakten von Dieselruß und Der p 1 (Hausstaubmilbenallergen) auf die Freisetzung von IL-8, RANTES und TNF- α (67). Partikel-Extrakte aus westdeutschen Großstädten hatten einen Einfluss auf die Histamin-Freisetzung aus humanen Basophilen und die Freisetzung von Histamin, Leukotrienen und IL-8 aus humanen neutrophilen Granulozyten (93).

Die Provokationstests am Menschen durch Diaz-Sanchez *et al.* zeigten nach intranasaler Applikation von Dieselrußpartikeln eine erhöhte IgE-Konzentration und eine erhöhte Menge an epsilon mRNA, die für IgE-Proteine kodiert, in der Nasenspülflüssigkeit (49). Auch die nasale Zytokinproduktion (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) und die Expression einiger CC Chemokine (RANTES, MIP-1 α , MCP-3) waren in Studien von Diaz-Sanchez *et al.* erhöht (52, 54). Dieselruß-Extrakte erhöhten bei Terada *et al.* die Adhäsion humaner Eosinophiler an nasale Epithelzellen und induzieren Degranulation in Eosinophilen (213). Die Anzahl entzündungsrelevanter Zellen, also Neutrophile, Mastzellen und T-Lymphozyten, war im Bronchialgewebe nach Kurzzeitexposition mit DEP erhöht (183). In Verbindung mit Allergenen steigern Dieselrußpartikel und ihre organischen Extrakte in sensibilisierten Personen die Parameter der allergischen Entzündung (133). Studien von Diaz-Sanchez *et al.* zeigten außerdem, dass die Sensibilisierung gegen ein Neoallergen durch nasale Provokation mit Dieselruß leichter induziert werden konnte als ohne (51).

1.3 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) bilden eine Stoffgruppe von organischen Verbindungen, die aus mindestens zwei miteinander verbundenen Benzolringen bestehen. Man spricht auch von kondensierten Ringsystemen. Diese Ringsysteme können mit Substituenten versehen sein, meist handelt es sich um Methylgruppen. Auch Derivate mit Heteroatomen zählt man zu den PAKs, wobei die Heteroatome (meist Stickstoff oder Sauerstoff) in Form von funktionellen Gruppen (Carboxylgruppen, Nitrogruppen, OH-Gruppen) an den Ring gebunden oder im Ringgerüst enthalten sind (Heteroaromaten). Polyzyklische Aromaten sind überwiegend neutrale, unpolare, wasserunlösliche Feststoffe (33).

PAKs kommen in organischen Brennstoffen bzw. ihren Abbauprodukten vor oder werden bei unvollständigen Verbrennungsprozessen oder thermischer Zersetzung aus organischem Material neu gebildet. Art und Menge der entstehenden Produkte werden hauptsächlich durch die Verbrennungsbedingungen, insbesondere durch die Temperatur und den Sauerstoffgehalt bestimmt. Bei niedrigen Temperaturen entstehen vorwiegend alkylierte PAKs, bei größerer Hitze die reinen Ringsysteme. Bei zunehmend pyrolytischen Bedingungen (also bei einem O₂-Defizit) wächst die Menge der gebildeten polyzyklischen Aromaten (5). Sie entstehen auch bei der Hitzebehandlung in Lebensmitteln, v.a. bei Grill-, Räucher- und Röstprozessen (6). PAKs werden in Böden, Sedimenten und in tierischer und pflanzlicher Matrix angereichert. Atmosphärische PAKs kommen gasförmig und Partikel-gebunden vor (5). Über die Nahrungskette werden PAKs angereichert, da sie durch Sorption an Organismen und durch Speicherung in Fett und Fettgewebe akkumulieren (109).

In der Münchner Außenluft finden sich PAKs in einer Größenordnung von 0,1-10 ng/m³, je nach Verkehrsbelastung (192). Die polyzyklischen Aromaten können durch Makrophagen und durch die Alveolar-Epithelbarriere aufgenommen werden und in den Blutkreislauf gelangen (79, 186).

PAKs treten in der Umwelt als Gemische auf, die hunderte von Einzelsubstanzen enthalten können (99). Aus praktischen Gründen wählt man deshalb für viele Untersuchungen einzelne PAKs aus, die die Stoffklasse repräsentieren. Aufgrund ihres häufigen Vorkommens in der Umwelt, ihrer relativ einfachen Nachweisbarkeit und ihres Gefährdungspotentials hat die Umweltbehörde der USA (US-EPA, US-

Environmental Protection Agency) aus der Vielzahl der Verbindungen 16 nicht substituierte PAKs als wichtigste Substanzen für die Untersuchung von PAK-Belastungen ausgewählt (EPA-PAKs). Es handelt sich hierbei um Naphthalin, Acenaphthylen, Acenaphthen, Fluoren, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren, Pyren, Benzo[*a*]anthracen, Chrysen, Benzo[*b*]fluoranthren, Benzo[*k*]fluoranthren, Benzo[*a*]pyren, Dibenzo[*a,h*]anthracen, Indeno[1,2,3-*c,d*]pyren und Benzo[*g,h,i*]perylene (218, Abb.6).

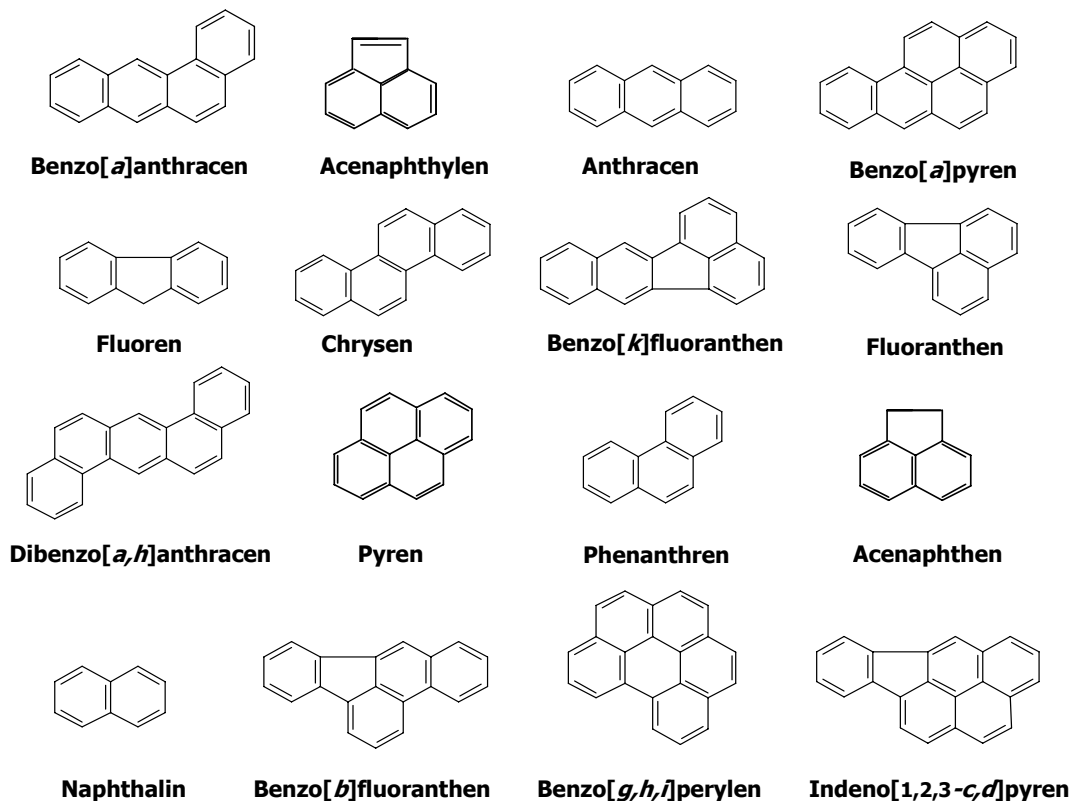


Abb.6: 16 PAKs der U.S. Environmental Protection Agency (EPA)

Die analytische Bestimmung der PAKs erfolgt meistens über GC-MS (Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie) (Quelle: DIN ISO 12884: 2000-12, Deutsches Institut für Normung DIN und Verein Deutscher Ingenieure VDI). Benzo[*a*]pyren ist unter anderem wegen seiner Kanzerogenität (202) eine der intensivsten untersuchten Verbindungen und stellt die Leitkomponente der Stoffklasse dar. Die an der Oberfläche der Dieselrußpartikel adsorbierten PAKs scheinen, neben dem Kohlenstoffkern (3, 90, 223) eine wichtige Rolle bei der angesprochenen Wirkung von Dieselrußpartikeln auf die Parameter der allergischen Entzündungsreaktion zu spielen. In gereinigten Basophilen allergischer und

nichtallergischer Probanden konnte dosisabhängig eine Erhöhung der Freisetzung von Histamin und IL-4 gezeigt werden, wenn sie mit organischen Extrakten aus Dieselruß inkubiert wurden (48). Kepley *et al.* zeigten eine Erhöhung der IgE-vermittelten Histamin-Produktion in humanen Basophilen durch Benzo[a]pyren, 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon und 3,6-Benzo[a]pyren-Chinon. Ebenso waren die PAK-Chinone in der Lage, die IgE-vermittelte IL-4-Produktion zu erhöhen (114). Adjuvante Effekte auf die IgE-Bildung in Mäusen wurden auch erhalten, wenn aus Dieselrußpartikeln extrahiertes Pyren anstelle der Partikel verwendet wurde (206). Ebenso eine Erhöhung der IgE-Produktion hatten in unterschiedlichen *in vitro*-Modellen aus Dieselruß extrahierte PAKs und Phenanthren zur Folge (210, 217). Schober *et al.* sammelten mit einem High Volume Sampler an einer stark befahrenen Straße in München in zwei Zeiträumen urbane Umweltaerosole. Es konnte gezeigt werden, dass organische Extrakte dieser Aerosole die CD63-Expression und damit die Aktivierung basophiler Granulozyten erhöhen. In den Extrakten wurde neben anderen Komponenten auch eine hohe Konzentration an PAKs gefunden, die höhere PAK-Konzentration in dem Extrakt mit der größeren Wirkung auf die CD63-Expression (193).

Bezüglich der Mechanismen, wie dieselrußassoziierte PAKs die IgE-Synthese beeinflussen können, herrscht insgesamt noch erheblicher Klärungsbedarf (133). Eine wichtige Rolle scheint die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einzunehmen, wobei die genauen Mechanismen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnten (53, 172). Enzymatische Umsetzungen der polyzyklischen Aromaten über Peroxidasen und Cytochrome P450 (CYP1A1, CYP1B1 und andere) führen über radikalische Zwischenstufen (u.a. reaktive Epoxide) zu Dihydrodiol-Epoxiden, Chinonen und anderen reaktiven Metaboliten. Epoxide und Dihydrodiol-Epoxide können DNA-Addukte bilden, und Chinone können über weitere Stoffwechselreaktionen zu reaktiven Sauerstoffspezies führen. Beispiele für ROS sind das Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal. ROS bewirken in der Zelle oxidativen Stress und damit reversible oder irreversible Zellschäden. Die Depletion von reduziertem Glutathion, die Inaktivierung von Enzymen, die Oxidation von Phospholipiden und die Aktivierung von Signalwegen, die zur Apoptose oder zur Transkription bestimmter Gene führen, sind typische schädigende Reaktionswege reaktiver Sauerstoffspezies (4, 172). ROS scheinen für die beschriebenen Effekte von Dieselrußpartikeln mitverantwortlich zu sein (237). Patienten, die bestimmte

Glutathion-S-Transferasen, die für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich sind, nicht exprimieren können, zeigen eine erhöhte Antwort auf nasale Provokation mit Dieselrußpartikeln (81).

1.4 Das Birkenpollenallergen Bet v 1

Da in dieser Arbeit mit dem Birkenpollenallergen gearbeitet wurde, soll dieses näher vorgestellt werden. Birken sind Laubbäume in der Familie der *Betulaceae* (Gattungen Erle und Birke) und gehören zu den Windbestäubern. Die Pollen sind die Träger der männlichen Erbinformation und für die sexuelle Reproduktion von Pflanzen essentiell. Von März bis Mai werden in Nordeuropa große Mengen an Birkenpollen ausgeschüttet und bereits bei geringer Luftbewegung fortgetragen (Abb.7).

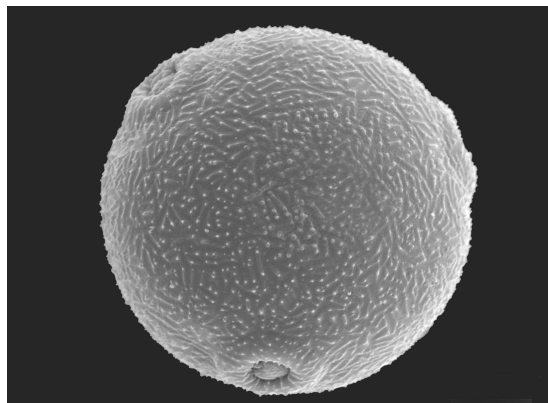


Abb.7: Birkenpollen

(Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme:
I.Weichenmeier, Zentrum Allergie und Umwelt)

Birkenpollen haben einen Durchmesser von etwa 19-22 μm (30). Aerodynamisch sind sie aber etwas kleiner und werden in der PM10-Fraktion gefunden (171). Partikel dieser Größe werden bevorzugt in den oberen Luftwegen (vor allem im Bereich der Nasenschleimhaut und des Rachenraumes) deponiert (200). Die Allergene sind Proteine oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht meist zwischen 5 und 70 kDa (194). Ein Allergen wird als Majorallergen bezeichnet, wenn mehr als 50% eines untersuchten Patientenkollektivs mit allergenspezifischen IgE-Antikörpern reagiert. Das Majorallergen der Birke *Betula verrucosa* ist das Bet v 1. In einer Studie von Moverare *et al.* zeigten 98 % der getesteten Birkenpollenallergiker aus Nordeuropa eine Allergie gegen Bet v 1 (149). Bei Bet v 1 handelt es sich um ein

Protein der Größe 17,4 kDa, ein sogenanntes PR (pathogenesis related)-Protein (41, 61). Es wurden bisher 42 Isoformen detektiert (41), nur 9 davon wurden aber in Pollen gefunden (9, 73, 144). Die dominante allergene Isoform ist Bet v 1.0101 (129, 207). Die Allergene können aus den Pollen in ein wässriges Milieu entlassen werden und die menschliche Schleimhaut penetrieren. So können die Symptome der allergischen Rhinitis ausgelöst werden (165). Wenn Pollen feucht werden, können sie zerplatzen. Die entstandenen kleinen Partikel sind mit Allergenen bedeckt. Auf diese Weise können sie tief in die Lunge eindringen und allergisches Asthma zur Folge haben (82, 211). Über die Funktion von Bet v 1 im Pollen bisher nicht viel bekannt. Das Protein zeigt Ribonukleaseaktivität, wird aber auch als Steroidträger gesehen, der eine Rolle in der Abwehr und Entwicklung der Pflanze spielt (34, 144). Birkenpollenallergiker reagieren aufgrund der hohen Ähnlichkeit der jeweiligen Majorallergene häufig zusätzlich auf Allergene von Hasel (Cor a 1) und Erle (Aln a 1) (220). Hasel und Erle blühen bereits im Januar bzw. Februar, was die symptomfreie Periode für Birkenpollenallergiker verkürzt.

Rekombinante Allergene werden durch Einfügen und Vermehren der für ein Allergen kodierenden DNS in einem fremden Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) hergestellt. Sie stellen im Gegensatz zu Pollen-Extrakten klar definierte Verbindungen dar, die bezüglich Proteinkonzentration und IgE-Reaktivität eindeutig quantifiziert werden können. Daher kommen sie in der allergischen Diagnostik und Immuntherapie häufig zur Anwendung (221). Das rekombinant hergestellte Majorallergen der Birke (Bet v 1.0101), rekombinantes Bet v 1 (rBet v 1) erwies sich im Hinblick auf die IgE-Bindungseigenschaften, die Induktion von T-Zell-Proliferation *in vitro* und die Freisetzung von Histamin aus Basophilen von Birkenpollenallergikern als weitgehend äquivalent zu natürlichem Bet v 1 (71). In nasalen Provokationen zeigte sich insgesamt eine etwas geringere Reaktion der allergischen Probanden auf rBet v 1 als auf natürlichen Birkenpollenextrakt, im Hauptpricktest erhielt man ein vergleichbares Ergebnis (216).

Untersuchungen von Behrendt *et al.* zeigten, dass Pollen, die in Industrieregionen und an Durchgangsstraßen in Nordrhein-Westfalen gesammelt wurden, feste Bindungen mit Schwebstäuben aufwiesen. Die Intensität dieser Agglomeration stand in deutlicher Beziehung zu Quantität und Qualität der Schadstoffbelastung (14).

Becker *et al.* beobachteten *in vitro* eine erhöhte Freisetzung von Proteinen und Allergenen aus Gräserpollen, wenn diese mit Schwebstaubextrakten inkubiert wurden (10). Während Pollen in trockener Atmosphäre sehr stabil sind, können Feuchtigkeit, Gewitter und Umweltschadstoffe zu einer Allergenfreisetzung führen (13, 15, 201, 212). Dann sind neben den Pollen selber auch allergenhaltige Aerosole aus Pollenfragmenten in der Luft als Allergenträger zu finden (13). Freigesetzte Allergene können an Schwebstäube, insbesondere an Dieselrußpartikel binden und, ebenso wie Pollenfragmente, tief in die Lunge gelangen und dort Symptome auslösen. Dieser Effekt wird unter anderem für erhöhtes Auftreten von Asthma-Symptomen nach Gewittern verantwortlich gemacht (120, 121).

1.5 Basophile Granulozyten

1.5.1 Allgemeines

Die basophilen Granulozyten (Abb.8) wurden im Jahr 1879 von Paul Ehrlich erstmals beschrieben, 1 Jahr nachdem er im Gewebe einen morphologisch ähnlichen Zelltyp entdeckt hatte, die Mastzelle (64). Dennoch sind sie bis heute einer der am wenigsten untersuchten Typen der Leukozyten (70). Basophile zeichnen sich durch einen segmentierten Zellkern und ihre mit basischen Farbstoffen anfärbbaren Granula aus. Mit weniger als 1% stellen sie den geringsten Anteil der zirkulierenden Leukozyten dar und sind mit einem Durchmesser von 10-14 µm auch die kleinsten Granulozyten (69, 105). Humane Basophile entwickeln sich im Knochenmark aus CD34⁺ Vorläuferzellen. Im Gegensatz zu Mastzellen, die im Bindegewebe differenzieren, werden sie als reife und differenzierte Zellen ins periphere Blut abgegeben. Das wichtigste Zytokin für die Differenzierung und Reifung der Basophilen ist das Interleukin-3 (70).

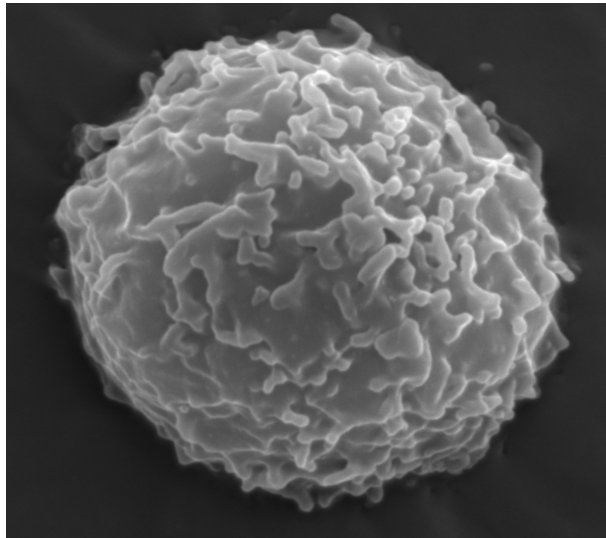


Abb.8: humaner basophiler Granulozyt
(Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme:
I. Weichenmeier, Zentrum Allergie und Umwelt)

Basophile exprimieren ebenso wie Mastzellen den hochaffinen $Fc\epsilon$ -Rezeptor. Auf beiden Zelltypen liegt er als Tetramer vor, das heißt, er besteht aus je einer α - und β - und zwei γ - Untereinheiten. Für die Signalübertragung ist der γ -Teil des Rezeptors verantwortlich (117). Das Antigen, der Rezeptor und das allergenspezifische IgE bilden einen stabilen Komplex, durch den ein intrazelluläres Signal ausgelöst wird (Aktivierung der Tyrosinkinase Lyn und Syk). Dies führt über komplexe Signaltransduktionsmechanismen schließlich zur Aktivierung der Zelle und zur Degranulation, Produktion von Zytokinen und Lipidmediatoren (104).

Bei der Degranulation von Basophilen wird eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt, die sich in 3 Gruppen einteilen lassen (112, 122):

1. in Granula gespeicherte Mediatoren: Histamin, Proteasen (z.B. α - und β -Tryptase), Peroxidasen, Carboxypeptidase A, β -Glucuronidase, Elastase, Chondroitinsulfat u.a.
2. Lipidmediatoren: v.a. Leukotrien C_4
3. Zytokine/Chemokine: Interleukin-4, Interleukin-13, Interleukin-8 und MIP-1 α

Die klassische Degranulation erfolgt durch Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran, ein Vorgang, der auch als anaphylaktische Degranulation bezeichnet wird. 1973 beschrieb Dvorak erstmals Basophile mit teilweise entleerten

Granula und zahlreichen Vesikeln zwischen diesen Granula und der Plasmamembran. Einige dieser Vesikel waren mit der Plasmamembran oder der Membran der Granula verschmolzen. Dvorak bezeichnete diese stückweise Granulaentleerung als Piecemeal-Degranulation (45, 59).

Die Quervernetzung der an den Rezeptor gebundenen IgE-Antikörper durch ein Allergen bewirkt v.a. drei Ereignisse: Zuerst fusionieren basophile Granula mit der Plasmamembran und setzen Histamin frei. Als nächstes wird der Lipid-Metabolismus in Gang gesetzt und LTC₄ produziert, und schließlich werden immunmodulatorische Zytokine synthetisiert (69).

Die Freisetzung der Mediatoren der Gruppen 1 und 2 und die Freisetzung von präformiertem IL-4 erfolgt innerhalb von Minuten, wenn die Zellen mit einem Anti-IgE-Antikörper stimuliert werden. Im Gegensatz dazu benötigt die Freisetzung von (neu synthetisiertem) IL-4 2-6 Stunden mit einem Maximum nach 1-2 Stunden. Die IL-13-Freisetzung benötigt 18-24 Stunden (78, 80, 148, 195).

Histamin führt zur Kontraktion der glatten Muskulatur in den Bronchien, Gefäßerweiterung und erhöhter Permeabilität der Gefäßwände, Dilatation kleinerer Gefäße und Schmerzen und Juckreiz durch Wirkung auf sensible Nervenendigungen (168).

Die Interleukine 4 und 13 aus Basophilen beeinflussen die Immunantwort durch Einwirkung auf andere Zellen, die in der allergischen Entzündungsreaktion eine Rolle spielen. IL-4 fördert die Entwicklung von T_H2-Lymphozyten aus T_H0-Lymphozyten. IL-4 und IL-13 stimulieren den Isotyp-Switch durch B-Zellen und damit die Menge an produziertem IgE. Beide Zytokine haben ferner eine wichtige Rolle bei der Hochregulation von Adhäsions-Molekülen (v.a. VCAM-1), welche wiederum die transendotheliale Migration einiger Zelltypen, v.a. von Eosinophilen, fördern (69). Diese Migration wird auch gefördert durch Eotaxin, einem CC-Chemokin aus Epithelzellen, dessen vermehrte Bildung ebenfalls von IL-4 und IL-13 angeregt wird (70).

LTC₄ ist ein starker Bronchokonstriktor, der bei allergischem Asthma eine wichtige Rolle spielt (168). Basophile sind in der Lage, ihren aktivierten Status und die LTC₄-Freisetzung über viele Stunden aufrechtzuerhalten (155), was offenbar eine wichtige Rolle bei chronischen, entzündlichen Erkrankungen spielt (69). IL-13 gilt auch als ein

Schlüssel-Mediator für allergisches Asthma (199). Basophile spielen somit in der Spätphase der allergischen Reaktion eine wichtige Rolle (Abb.9).

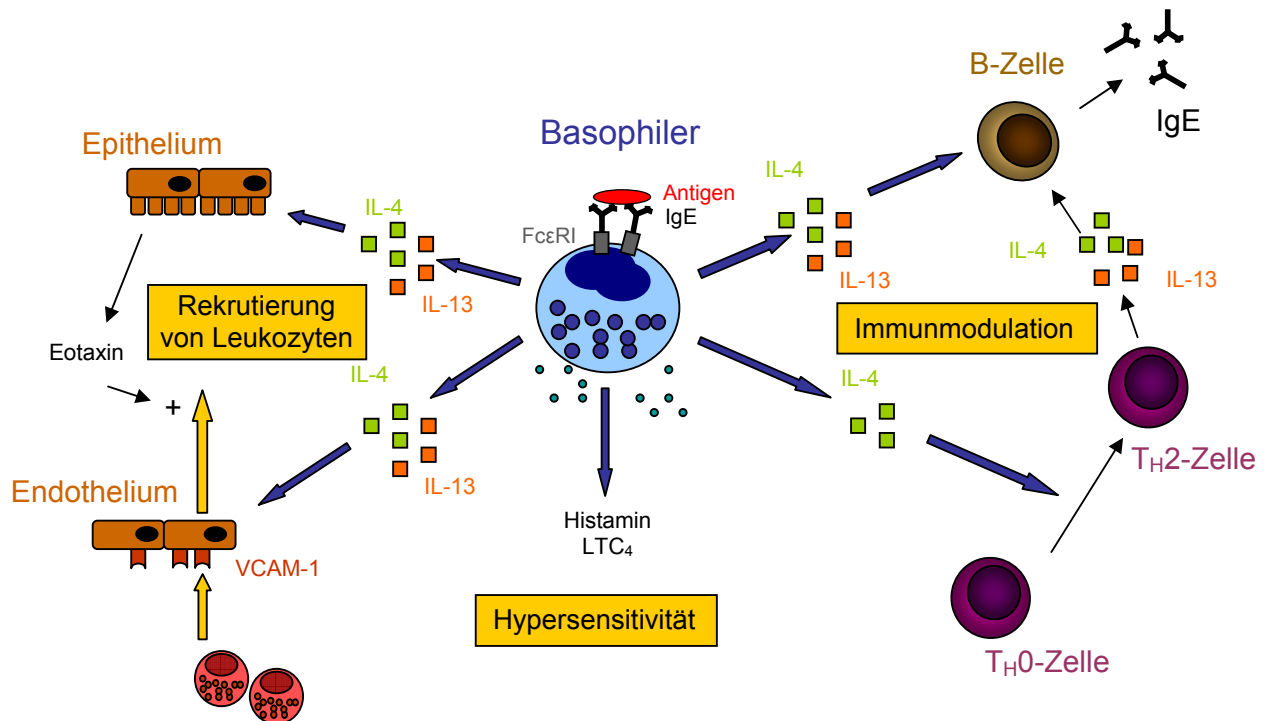


Abb.9: schematische Darstellung der Aktivitäten basophiler Granulozyten nach Binden eines Antigens (nach 70, 195). Nach Bindung eines Antigens und Quervernetzung der an den FcεRI-gebundenen IgE-Antikörper führt die Freisetzung von IL-4 und IL-13 zur erhöhten Produktion von IgE-Antikörpern durch B-Zellen. IL-4 bewirkt außerdem die Bildung von TH₂-Zellen aus TH₀-Zellen, welche wiederum IL-4 und IL-13 produzieren. Histamin führt direkt zur Symptomatik der allergischen Rhinitis, LTC₄ spielt eine wichtige Rolle beim allergischen Asthma. IL-4 und IL-13 erhöhen außerdem die Freisetzung von Eotaxin aus Epithelzellen, wodurch die transendotheliale Migration von v.a. Eosinophilen, die bereits durch die Hochregulation von Adhäsionsfaktoren wie VCAM-1 begünstigt ist, zusätzlich angeregt wird.

IL-3 ist dabei ist nicht nur verantwortlich für Wachstum und Differenzierung der Basophilen, sondern auch für deren Aktivierung. IL-3 ist in der Lage, in großen Mengen auch ohne eine IgE-Rezeptor-Quervernetzung in Verbindung mit Komplementaktivierung (C5 Peptide) Mediatorfreisetzung aus Basophilen zu induzieren, was schließlich auch für eine wichtige Bedeutung dieses Zelltyps in nichtallergischen Entzündungskrankheiten spricht (60, 69). Auf ihrer Oberfläche exprimieren Basophile die IL-3 α-Kette (CD 123) (69).

Basophile Granulozyten migrieren an die Orte der allergischen Entzündungsreaktion. Die Anwesenheit von Basophilen im Gewebe korreliert positiv mit der Schwere der Erkrankung und negativ mit der Zahl der Basophilen im peripheren Blut (199). Bei Asthmaerkrankungen werden erhöhte Zahlen im Sputum der Bronchialschleimhaut gemessen, bei allergischer Rhinitis akkumulieren Basophile in der Nasenschleimhaut, was im Sekret nachweisbar war (85, 116). Reguliert werden diese Effekte zum einen durch Zytokine, die das Anheften von Basophilen an Endothelzellen verstärken. Durch Hochregulieren von sogenannten Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 lösen beispielsweise Interleukin-1 und Interleukin-4 diese Effekte aus (24, 195). Zum anderen wird das Einwandern von Basophilen ins Gewebe durch Gradienten von chemotaktischen Faktoren reguliert. Die Zellen zeigen *in vitro* Chemotaxis auf lymphocyte-derived factors, C5a, IL-8 und andere (113, 134, 136). Die Reaktion der Basophilen auf diese Chemoattraktantien wird wiederum moduliert durch IL-3, Interferon und Histamin (135, 137, 219).

1.5.2 Aktivierungsmarker

Die Aktivierung der Basophilen wird von Veränderungen der Expression von Oberflächenmolekülen begleitet. Die beiden wichtigsten Aktivierungsmarker sind CD63 und CD203c. CD203c ist eine Ectonukleotidpyrophosphatase/-phosphodiesterase, die fast ausschließlich auf Mastzellen, Basophilen und ihren Vorläuferzellen zu finden ist. Bindung von IgE-Antikörpern und Quervernetzung des hochaffinen Fc ϵ -Rezeptors führen zur schnellen Hochregulation von CD203c auf der Zelloberfläche (35, 36). CD63 (auch gp53 genannt) ist ein Glykoprotein mit einer Masse von 30-60 kDa und gehört zur Familie der Tetraspanine, die funktionell an Zelladhäsionsprozessen und Signaltransduktion beteiligt sind (25, 62, 215). Es wird in Basophilen, Makrophagen, Mastzellen und Platelets gebildet (62). Bei der Degranulation wird CD63, welches in der ruhenden Phase in intrazytoplasmatischen Granula vorliegt, an die Oberfläche transloziert (62, 119). CD63 ist der einzige Oberflächenmarker, der bei Aktivierung *de novo* auf der Zelloberfläche erscheint und dort vorher überhaupt nicht vorhanden ist (25). Bei Aktivierung der Zelle kommt es zu einer Fusion von Granula und Plasmamembran und zum Erscheinen von CD63 auf der Oberfläche. Die Expression dieses Aktivierungsmarkers spiegelt gut die Freisetzung von Mediatoren wie Histamin wieder (184), was in sogenannten

Basophilenaktivierungstests ausgenutzt wird. Hierbei werden fluoreszierende Antikörper an Proteine wie CD63 gebunden, die auf der Oberfläche aktivierter Basophiler vorhanden sind. Die Fluoreszenz wird durchflusszytometrisch bestimmt (Abb.10). Basophilenaktivierungstests stellen eine effiziente Methode dar, um mit Hilfe der Expression von Oberflächenmarkern größere Mengen an Proben auf ihre quantitative Beeinflussung durch Allergene und andere Substanzen zu prüfen.

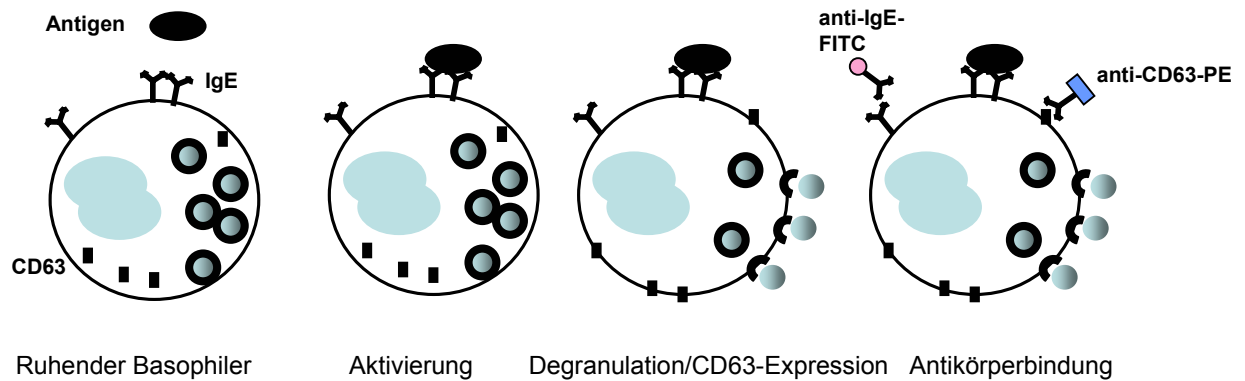


Abb.10: Basophilenaktivierungstest. CD63 wird auf der Oberfläche aktivierter Basophiler exprimiert. Durch Bindung an die fluoreszierenden Antikörper anti-IgE-FITC und anti-CD63-PE kann der Anteil der aktivierten Basophiler durchflusszytometrisch bestimmt werden (62).

2 Ziel der Arbeit

Organische Extrakte von Umweltaerosolen erhöhten die rBet v 1 - induzierte Basophilen-Aktivierung bei Birkenpollenallergikern (193). In dieser Arbeit soll der Einfluss von PAKs als organischer Bestandteil von Umweltaerosolen auf die Basophilenaktivierung von Birkenpollenallergikern und gesunden Probanden untersucht werden. Fokussiert werden soll insbesondere auf mögliche synergistische Effekte von PAKs und Bet v 1 auf sensibilisierte Basophile. Bet v 1 ist das Majorallergen der Birke und ein Aeroallergen, welches für einen großen Teil der Allergien in Mittel- und Nordeuropa verantwortlich ist und auf demselben Weg aufgenommen wird wie die organische Phase von Umweltaerosolen. Stellvertretend für die Klasse der PAKs wird der EPA-PAK-Standard herangezogen, eine Mischung aus 16 in der Umwelt bedeutsamen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Zunächst soll ein Probandenkollektiv von Birkenpollenallergikern und nicht-allergischen Kontrollpersonen aufgestellt werden. Die Probanden sollen sorgfältig mittels Prick-Testung, RAST-Testung und Befragung charakterisiert werden. Es soll überprüft werden, ob alle Birkenpollenallergiker eine rBet v 1 - abhängige Aktivierung zeigen. Die Basophilenaktivierung soll mittels Bestimmung der CD63-Expression auf der Oberfläche aktivierter Basophiler ermittelt werden. Hierbei wird heparinisiertes Vollblut mehrerer allergischer und nicht-allergischer Probanden mit verschiedenen Konzentrationen des EPA-Gemisches alleine und in Koinkubation mit rBet v 1 im Basotest[®] mittels Durchflusszytometrie getestet.

Anschließend soll die Wirkung einzelner Vertreter der PAKs auf aufgereinigte basophile Granulozyten näher bestimmt werden, wofür Benzo[a]pyren und Phenanthren ausgewählt wurden. So sollen auch Unterschiede auf die Mediator-freisetzung durch eine kanzerogene und eine nicht-kanzerogene Substanz getestet werden. Hierfür werden Basophile von Birkenpollenallergikern und gesunden Kontrollpersonen mit Hilfe von MACS-Säulen aufgereinigt und mit Einzel-PAKs mit und ohne Antigen inkubiert. Die Freisetzung verschiedener Zytokine soll zunächst simultan mittels Zytokin-Antikörper-Array halbquantitativ getestet werden. Mit verschiedenen sensitiven ELISA-Methoden sollen interessante Ergebnisse

anschließend nach Stimulation mit PAKs alleine oder nach Koinkubation mit rBet v 1 quantitativ untersucht werden.

PAKs und ihre redoxaktiven Metaboliten können durch Enzyminduktion oder intrazelluläres Redox-Cycling reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden (26, 141, 167). Außerdem können, katalysiert durch Cytochrome und Peroxidasen, aus PAKs reaktive Radikal-Kationen entstehen (40, 198). Um letztlich auch einen Hinweis auf die Mechanismen der Allergie-fördernden Wirkung von PAKs zu erhalten, werden die Untersuchungen auf die Mediatorfreisetzung auch mit den redoxaktiven PAK-Derivaten 1,6-Benzo[*a*]pyren-Chinon und Phenanthren-9,10-Hydrochinon durchgeführt. Eine wichtige Enzymgruppe, die für die Detoxifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies und der elektrophilen PAK-Metabolite verantwortlich ist, ist die Gruppe der Glutathion-S-Transferasen (GSTs). Deshalb soll am Beispiel der GSTs M1 und P1 auch der Frage nachgegangen werden, ob der Phase II – Fremdstoff-metabolismus eine Rolle in der Immunantwort auf polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe spielt, wie es für Dieselrußpartikel bereits gezeigt wurde (81). Die Untersuchung der Beteiligung der Glutathion-S-Transferasen soll durch Genotypisierung der Probanden mittels PCR und Real-Time-PCR erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Die Blutentnahmen erfolgten von insgesamt 21 freiwilligen Probanden im Alter zwischen 22 und 55 Jahren, davon waren 12 Birkenpollenallergiker und 9 Kontrollpersonen. Eine eventuelle antiallergische Medikation der Patienten wurde mindestens 14 Tage vor der Blutentnahme abgesetzt. Die Untersuchungen fanden außerhalb der Birkenpollenflugzeit (März bis Mai) statt.

Birkenpollenallergiker

Auswahlkriterium für die Aufnahme in die Studie war das Vorliegen von Heuschnupfen und die Sensibilisierung gegenüber Birkenpollenallergen. Alle Patienten berichteten über die Symptome der Rhinokonjunktivitis allergica (Fließschnupfen, Niesreiz, nasaler Juckreiz u. nasale Verstopfung, Störungen des Geruchs- u. Geschmacksempfindens u.a.). Spezifisches IgE (sIgE) gegen Birkenpollen (t3) und gegen rekombinantes Bet v 1 (t215) wurde im Serum der Patienten mit dem UniCAP® System (Phadia AB, Uppsala, Schweden) quantifiziert. Voraussetzung war RAST-Klasse 2 oder höher (sIgE \geq 0,7 kU/l). Alle Patienten zeigten vierfach positive Pricktest-Reaktionen (Quaddeldurchmesser $>$ 6 mm, Erythemdurchmesser $>$ 20 mm) auf Birkenpollenextrakt (Allergopharma, Reinbek). Die Untersuchung umfasste 5 weibliche und 7 männliche Testpersonen im Alter zwischen 22 und 35 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 26,8 (\pm 3,5) Jahren, wobei sowohl Nichtraucher als auch Raucher an der Studie beteiligt waren (Tab.2). 12 Stunden vor der Blutentnahme durfte nicht geraucht werden.

Nummer Patient	♀♂	Alter	Prick-Test Birkenextrakt	Gesamt-IgE in kU/l	spezifische IgE-Antikörper in kU/l (Klasse)		Raucher
					Birke (t3*)	rBet v 1 (t215*)	
I	♀	27	++++	123	13,6 (3)	11,9 (3)	ja
II	♂	25	++++	1562	29,7 (4)	7,8 (3)	nein
III	♀	22	++++	138	32,1 (4)	28,7 (4)	nein
IV	♀	35	++++	122	14,5 (3)	14,6 (3)	ja
V	♂	25	++++	340	86,2 (5)	35,1 (4)	ja
VI	♀	23	++++	127	5,9 (3)	5,9 (3)	nein
VII	♂	29	++++	19	2,6 (2)	2,7 (2)	nein
VIII	♀	28	++++	26	18,0 (4)	18,7 (4)	nein
IX	♂	30	++++	191	33,3 (4)	31,8 (4)	nein
X	♂	25	++++	68	3,9 (3)	3,8 (3)	nein
XI	♂	26	++++	83	5,8 (3)	5,7 (3)	nein
XII	♂	27	++++	593	9,3 (3)	8,6 (3)	ja

Tab.2: Charakterisierung der Birkenpollenallergiker; +++++: Quaddeldurchmesser > 6 mm und Erythemdurchmesser > 20mm; *ImmunoCAP®, Phadia AB, Uppsala, Schweden; m = männlich, w = weiblich

Gesunde Kontrollprobanden

Keine der Kontrollpersonen berichtete über die Symptome der Rhinokonjunktivitis allergica. Spezifisches IgE gegen Birkenpollen oder rekombinantes Bet v 1 konnte im Serum nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchung umfasste 8 weibliche und eine männliche Testperson im Alter zwischen 24 und 55 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 31,7 (\pm 11,4) Jahren (Tab.3).

Nummer Kontrolle	♀♂	Alter	Prick-Test Birkenextrakt	Gesamt-IgE in kU/l	spezifische IgE-Antikörper in kU/l (Klasse)		Raucher
					Birke (t3*)	rBet v 1 (t215*)	
1	♂	48	-	60	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	nein
2	♀	24	-	10	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	nein
3	♀	27	-	20	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	nein
4	♀	27	-	20	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	ja
5	♀	27	-	55	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	nein
6	♀	55	-	39	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	ja
7	♀	25	-	16	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	nein
8	♀	27	-	188	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	nein
9	♀	25	-	173	< 0,35 (0)	< 0,35 (0)	nein

Tab.3: Charakterisierung der Kontrollen; -: keine Quaddel und kein Erythem; *ImmunoCAP®, Phadia AB, Uppsala, Schweden; m = männlich, w = weiblich

3.2 Chemikalien, Antikörper, Verbrauchsmaterial und Geräte

Chemikalien

Aqua ad injectabilia	DeltaSelect, Pfullingen, Bezug über die Apotheke des Klinikums rechts der Isar, TU München
Basophil Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Best. Nr. 130-053-401
Basotest	Orpegen Pharma, Heidelberg, Best. Nr. 10-0500
Bet v 1 a (Bet v 1.0101)	Biomay, Wien, Österreich
Benzo[a]pyren	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Best. Nr. 12780
1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck, Darmstadt, Best. Nr. 12018
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, Best. Nr. 116743
D-PBS (w/o Ca/Mg)	Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland, Best. Nr. 14190-094
EDTA 0,5 M	Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland, Best. Nr. 15575-038
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Best. Nr. 3302-P 200709
Häma-Färbung	Niepötter Labortechnik, Bürstadt, Best. Nr. 854200.0000
Heparin-Natrium-250000	Ratiopharm GmbH, Ulm, Bezug über die Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München

Histamin ELISA	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich, Best. Nr. IM2015
Histopaque-1077	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA, Best. Nr. 1077-1
Histopaque-1119	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA, Best. Nr. 1119-1
Human Cytokine Antibody Array III	BioCat GmbH, Heidelberg, Best. Nr. H0108009C
Human IL-13 ELISA	Bender MedSystems, Wien, Österreich, Best. Nr. BMS231/3
Interleukin-8	Calbiochem, San Diego, USA, Best. Nr. 407673
ImmunoCAP [®] Development Kit	Phadia AB, Uppsala, Schweden, Best. Nr.: 10-9263-01
ImmunoCAP [®] Tryptase	Phadia AB, Uppsala, Schweden, Best. Nr.: 10-9303-01
ImmunoCAP [®] Tryptase Calibrators	Phadia AB, Uppsala, Schweden, Best. Nr.: 10-9302-01
ImmunoCAP [®] Washing Solution	Phadia AB, Uppsala, Schweden, Best. Nr.: 10-9422-01
Ionomycin	Merck, Darmstadt, Best. Nr. 407950
Leukotrien B ₄	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, Best. Nr. 20110
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland, Best. Nr. 25030-032
Lymphoprep	Axis-Shield, Oslo, Norwegen, Best. Nr. 1114545
MEM Non-Essential Amino Acids (100x)	Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland, Best. Nr. 11140-035
MEM Sodium Pyruvate (100 mM)	Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland, Best. Nr. 11360-039

2-Mercaptoethanol	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Best. Nr. M7522
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Best. Nr. 1.06688.0100
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Best. Nr. 106404
PAH-Mix 154	Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Augsburg, Best. Nr. XS20965400DS
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000:10000)	Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland, Best. Nr. 15140-148
Phenanthren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Best. Nr. P-2528
Phenanthren-9,10-Hydrochinon (als Acetoxy-Derivat)	Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf
Prick-Test-Lösung Birke (50.000 SBE/ml)	Allergopharma, Reinbek
QIAamp DNA Blood Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Best. Nr. 51183
QuantiGlo IL-8 Chemiluminescent Immunoassay	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt, Best. Nr. Q8000B
Quantikine IL-4 HS Immunoassay	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt, Best. Nr. HS400
RPMI-1640	Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Schottland, Best. Nr. 21875-034
Taq Man [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA, Best. Nr. 4304437
Taq Man [®] SNP Genotyping Assay GST P1	Applied Biosystems, Foster City, USA, Best. Nr. 4331183c_3237198_1_
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Best. Nr. 108603

Trypan Blue Solution (0,4 %)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen,
Best. Nr. T8154

Water
(steril-filtriert, Endotoxin-frei)

Sigma-Aldrich Chemie, München,
Best. Nr. W3500

Antikörper

Anti-BDCA-2-FITC

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch
Gladbach,
Best. Nr. 130-090-510

CD3-FITC

BD Biosciences, Heidelberg,
Best. Nr. 555332

CD19-PE

BD Biosciences, Heidelberg,
Best. Nr. 555413

CD61-PE

BD Biosciences, Heidelberg,
Best. Nr. 555754

CD123-PE

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch
Gladbach,
Best. Nr. 130-090-899

Mouse IgG₁-FITC

BD Biosciences, Heidelberg,
Best. Nr. 555748

Mouse IgG₁-PE

BD Biosciences, Heidelberg,
Best. Nr. 555749

Verbrauchsmaterial

Eppendorf Tubes 1,5 ml

Eppendorf, Hamburg,
Best. Nr. 0030 015.002

Falcon Polystyrol-Röhrchen 5 ml

BD Biosciences, Heidelberg,
Best. Nr. 352052

Falcon Polypropylen-Röhrchen 15 ml/ 50 ml LS Columns (MACS)	BD Biosciences, Heidelberg, Best. Nr. 352070/352096 Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Best. Nr. 130-042-401
50 ml-Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg, Best. Nr. 300136
Mediprick-Lanzette	Servoprax, Wesel Best. Nr. B2 0111
S-Monovette EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Best. Nr. 02.1066.001
S-Monovette Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Best. Nr. 02.1065
S-Monovette Serum	Sarstedt, Nümbrecht, Best. Nr. 02.1063
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA; Size: 4" x 125'
Sterilfiltereinheit 250 ml (0,2 µm)	Nalgene, Rochester, N.Y., USA Best. Nr. 168-0020
Sterilfiltereinheit 500 ml (0,22 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Best. Nr. 83.1823.001
Transwell-Platten	Corning Incorporated, NY, USA, Best. Nr. 3421
48-Well Platte, steril, Flachboden	Nunc, Roskilde, Dänemark, Best. Nr. 167008

Geräte

Chemilumineszenz-Messgerät	Chemi-Smart 5000, PeqLab, Erlangen
Durchflusszytometer	FACSCalibur™, BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage	MC1 Research, Sartorius, Göttingen

HPLC (high performance liquid chromatographie)	Thermo Finnigan: Spectra System P 4000 Spectra System AS 3000 Spectra System UV 6000LP Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Säule: Eurospher-100 C18, Länge 250 mm, ID 4 mm, Füllmaterial 5 µm (KNAUER, Berlin)
Horizontalschüttler	KS 125 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
ImmunoCAP™ 100	Phadia AB, Uppsala, Schweden
Lichtmikroskop	Leica DMRB mit PCO cooled 12 bit CCD Camera, Leica, Solms
Lumineszenz-Platten-Reader	Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg
MACS Cell Separator	QuadroMACS Separator, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Microtiter Plate Reader	MRX Revelation, Thermo Labsystems, Waltham, MA, USA
Mikrozentrifuge	Sigma 1-15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Real Time PCR	ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, USA
Schüttler mit Schwenkbewegung	Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Thermo Cycler	4-bay high throughput Thermal Cycler, DNA Engine Tetrad, Biorad, Hercules, CA, USA
Ultraschallbad	Sonorex Super RK103H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	SW21, Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau

3.3 Medien, Puffer und Lösungen

RPML complete (ohne humanes Serum):

478,3 ml RPMI-1640, 5 ml 200 mM L-Glutamin (2 mM), 5,6 ml 100x Non-Essential Amino Acids, 5,6 ml 100 mM Sodium Pyruvate (1,1 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (je 100 Einheiten/ml), 500 µl 50 mM Mercaptoethanol (=50 µM); sterilfiltriert

MACS-Puffer:

500 ml D-PBS w/o Ca/Mg, 2 ml 0,5 M EDTA (2mM), 2,5 g BSA (0,5 %); sterilfiltriert und entgast

D-PBS mit EDTA:

500 ml D-PBS w/o Ca/Mg, 5 ml 0,5 M EDTA (5mM); steril

FACS-Puffer:

475 ml D-PBS w/o Ca/Mg, 20 mg Natriumazid (0,02 %), 25 ml FBS (5 %)

Propidiumiodid-Lösung:

2,5 mg Propidiumiodid in 50 ml D-PBS w/o Ca/Mg

3.4 Methoden

3.4.1 Pricktest

Der Pricktest wurde gemäß der diagnostischen Praxis der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein durch Aufbringen eines Tropfens wässrigen Birkenpollenextraktes (Allergopharma, Reinbek) und anschließendem Anstechen der Haut mit einer standardisierten Prick-Nadel (Servoprax, Wesel) in definierter Eindringtiefe auf der inneren Seite des Unterarms der Probanden durchgeführt. Nach 15 Minuten konnte die Testlösung abgewischt und die Reaktion abgelesen werden (57, 176). Eine Quaddelbildung von einem Durchmesser größer als 3 mm sowie eine Erythembildung mit Durchmesser größer als 5 mm wurde als

positives Ergebnis gewertet. Für die Positivkontrolle wurde 0,1 % Histamin verwendet, die Negativkontrolle wurde mit 0,9 % NaCl durchgeführt.

3.4.2 Messung des spezifischen IgE

Spezifisches IgE wurde im Allergielabor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein aus Patientenserum mittels CAP-Testung bestimmt. Den Probanden wurden 9 ml Vollblut aus der Armvene in Serum-Monovetten entnommen. Das Röhrchen wurde ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bei 3000xg 10 min. zentrifugiert und anschließend das gelb gefärbte Serum abpipettiert. Beim CAP-Test ist das relevante Allergen kovalent an ein Träger-Polymer gebunden. Spezifisches IgE der Serum-Probe bindet an dieses Allergen und wird mit einem fluorimetrischen Immunoassay nachgewiesen. Die Ergebnisse werden semi-quantitativ nach Klassen angegeben, wobei 0 für negativ, 1 für sehr schwach positiv und die Klassen 2 – 6 für positiv (mit steigender Intensität) stehen (Tab.4).

Die Messung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers (ImmunoCAP®, Phadia AB, Uppsala, Schweden) und wurde sowohl für Birkenpollenextrakt als auch für r Bet v 1 durchgeführt.

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.4: Beurteilung der CAP-Klassen (Phadia AB, Uppsala, Schweden)

3.4.3 Quantifizierung der Basophilenaktivierung

Für die Bestimmung der Basophilenaktivierung wurde ein kommerziell erhältliches Testsystem benutzt, der Basotest[®] (Orpegen Pharma, Heidelberg), der die quantitative Bestimmung der CD63-Expression auf der Oberfläche humaner basophiler Granulozyten ermöglicht. Das Prinzip des Tests beruht auf der Bindung des monoklonalen Antikörpers anti-IgE-PE an humanes Immunglobulin E (und damit an alle Basophilen im Blut) und der gleichzeitigen Färbung aktivierter Basophiler mit anti-gp53-FITC, welches an CD63 (gp53) bindet und damit nur die aktivierten Basophilen markiert (siehe Abb.10).

Im Testkit sind der Stimulationspuffer (100 ng/ml IL-3 nach Rekonstitution des Lyophilisats mit Wasser), ein Zweifarb-Antikörperreagenz mit anti-IgE-PE und anti-gp53-FITC, eine Lösung des Peptids N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP; 2 µM nach Rekonstitution in Waschpuffer), eine Lysing Solution (1x nach 1:10 Verdünnung mit Wasser) und die Salze für den Waschpuffer (PBS-gepuffert) zur Rekonstitution in Wasser enthalten. Zur Rekonstitution und Verdünnung wurde ausschließlich steril-filtriertes Reinstwasser eingesetzt.

Die EPA-PAKs wurden in hochreiner Form (> 99 %; Dr. Ehrenstorfer, Augsburg) in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst eingesetzt. Die Konzentration aller 16 Substanzen in der Stock-Lösung betrug 100 mg/l, die Gesamtkonzentration der PAKs lag somit bei 1600 mg/l. Die EAP-PAKs wurden in Verdünnungsreihen in der PBS-gepufferten Waschlösung in Konzentrationen von $7,2 \times 10^{-4}$ bis 727 ng/ml in den Basotest[®] eingesetzt. DMSO-Lösungsmittelkontrollen wurden in den entsprechenden Verdünnungen mitgeführt, die DMSO-Konzentration lag in allen Versuchen unter 0,05 %.

Den Probanden wurden 9 ml Vollblut aus der Armvene in Lithium-Heparin Monovetten entnommen. Das heparinisierte Blut wurde durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Pro Ansatz wurden 100 µl Blut auf den Boden eines 5 ml Probenröhrchens pipettiert, 20 µl Stimulationspuffer (entspr. 2 ng IL-3) dazugegeben und gemischt. Alle Mischvorgänge wurden auf einem Vortex-Mischer durchgeführt, wobei stets darauf geachtet werden musste, dass kein Blut an den Röhrchenwänden haften bleibt. Die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und 10 min. bei 37 °C

im Wasserbad inkubiert. Als nächstes folgte die Zugabe von 100 µl der jeweiligen Test- oder Kontrollsubstanz ($7,27 \times 10^{-4}$ bis 727 ng/ml EPA-PAKs, 0,001 bis 4500 ng/ml rBet v 1). Außerdem wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Für die Negativkontrolle wurden 100 µl Waschpuffer in das Röhrchen gegeben, für die Positivkontrolle 100 µl der 2µM Lösung des chemotaktischen Peptids fMLP. Beides wurde gemischt und 20 min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Durch 5 min. auf Eis wurde die Degranulation der Proben abgestoppt. In jede Probe wurden 20 µl des Zweifarb-Antikörperreagenzes pipettiert, gemischt und 20 min. auf Eis inkubiert. Das Eisbad wurde durch Abdeckung vor Lichteinfall geschützt. Nach der Färbung wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml Lysing Solution, 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln und anschließender Zentrifugation (5 min., 250 g, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die Proben wurden mit je 3 ml Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert (5 min., 250xg, 4 °C), der Überstand dekantiert und mit 300 µl Waschpuffer versetzt. Die Proben wurden lichtgeschützt im Eisbad aufbewahrt und innerhalb von 2 Stunden gemessen (Abb.11).

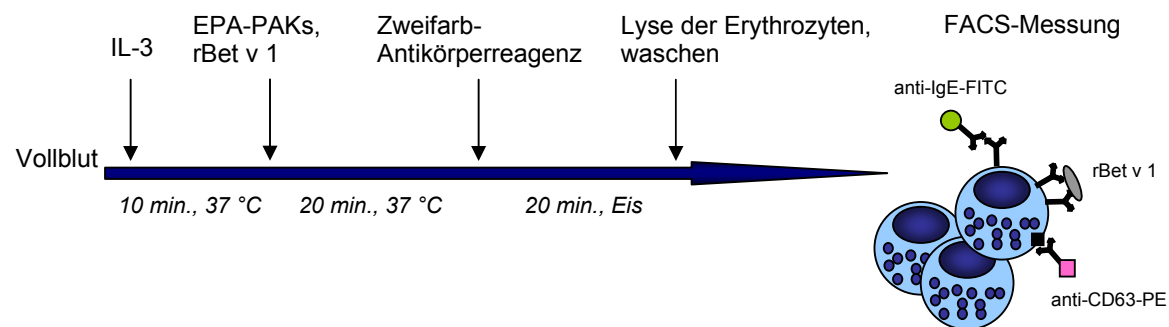


Abb.11: Schema des Basophilenaktivierungstest

3.4.4 Durchflusszytometrische Messung

Ein Durchflusszytometer (FACS, „fluorescence activated cell sorter“) ist ein Instrument zur Messung verschiedener Zelleigenschaften wie Größe, Granularität oder Fluoreszenz (nach Bindung an Fluoreszenz-konjugierte Antikörper). Die Zellen werden in einem Überschuss an Salzlösung durch eine dünne Glaskapillare gepresst und einzeln an einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm vorbeigeleitet. Dabei wird das Laserlicht zum einen an den Zellen gestreut. Photomultiplier messen so die Größe und Granularität der Zellen. Man unterscheidet hier das Vorwärtsstreulicht

(Forwardscatter, FSC) als Maß für die Größe und das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) als Maß für die Granularität der Zellen. Zum anderen werden die gebundenen Fluoreszenz-Farbstoffe zur Emission von Licht angeregt. Dessen Intensität kann von den Photomultipliern mit Hilfe der entsprechenden Filter für die Wellenlängen des jeweiligen Farbstoffes bestimmt werden. So können Rückschlüsse auf die an die Zellen gebundenen Antikörper und damit auf die Expression entsprechender Oberflächenmarker getroffen werden. Im Sensor FL-1 mit einem Filter von 530 nm wird das emittierte Licht des Fluoreszenzfarbstoffes FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) detektiert, bei 585 nm wird in FL-2 die Emission von PE (Phycoerythrin) gemessen. Der Sensor FL-3 erfasst Licht der Wellenlänge 630 nm, das durch den Farbstoff Propidiumiodid (PI) emittiert wird.

Die Immunfluoreszenzen in dieser Arbeit wurden mit dem FACSCalibur™ Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, mit CellQuest™ Software) analysiert und ausgewertet. Im Rahmen des Basotests wurde der Prozentsatz an aktivierten Basophilen analysiert. Im FL-2-Kanal wird ein Auswertefenster („Gate“) auf basophile Granulozyten als Zellen mit sehr hoher IgE-Expression und somit starker PE-Fluoreszenz eingegrenzt. Pro Probe wurden 1000 Zellen in diesem Gate analysiert. Daraus wird der Prozentsatz an Basophilen bestimmt, die das Aktivierungsantigen gp53 (CD63) exprimieren (Abb.12).

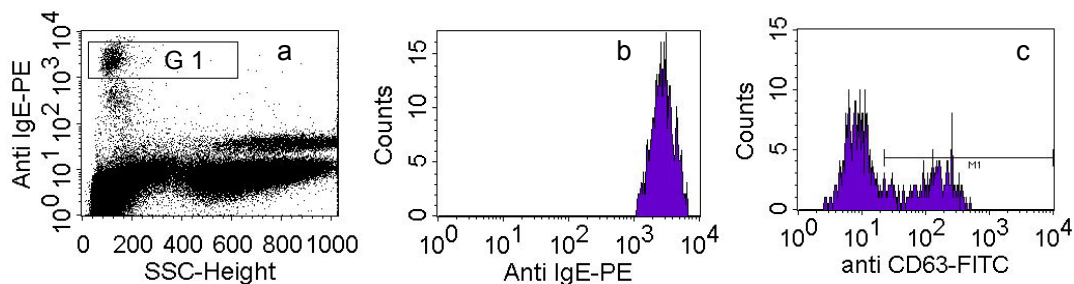


Abb.12: Durchflusszytometrische Bestimmung der Basophilenaktivierung

- a) Gate G1 der Population mit starker PE-Fluoreszenz im „Dot-Plot“
- b) IgE⁺-Population der basophilen Granulozyten im Histogramm
- c) CD63⁺-Population bei Inkubation mit rBet v 1 im Histogramm

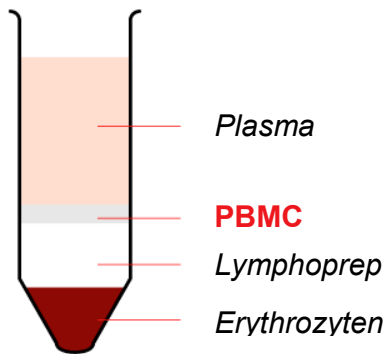
Um Toxizität der verwendeten Reagenzien auszuschließen, wurde die Anzahl nekrotischer Basophiler nach der Aufreinigung und Inkubation der Zellen durch Färbung mit PI bestimmt. PI ist ein geladenes Molekül und passiert nicht die Zellwand intakter Zellen. Es kann nur in Zellen gelangen, deren Zellwand Schäden

aufweist, und interkaliert dort in die im Zellkern enthaltene DNA. Die Propidium-Iodid-Fluoreszenz wurde im FL-3-Kanal gemessen.

3.4.5 Isolierung humaner basophiler Granulozyten

Basophile Granulozyten wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, periphere blood mononuclear cells) gewonnen. Die PBMC-Fraktion wurde durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, und daraus wurden die basophilen Granulozyten durch magnetische Selektion mit Hilfe des MACS-Systems (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) isoliert.

Um die PBMCs zu erhalten, wurden den Probanden jeweils 200 ml Vollblut aus der Armvene in heparinisierte 50 ml-Spritzen entnommen. Jeweils 20 ml Blut wurden mit 30 ml D-PBS (w/o Ca/Mg) verdünnt und vorsichtig gemischt. Je 25 ml so verdünntes Blut wurden in sterilen 50 ml Falcon Polypropylen-Röhrchen langsam auf 20 ml Lymphoprep-Trennmedium geschichtet, wobei sich die Phasen nicht mischen durften. Anschließend wurde bei Raumtemperatur (RT) 15 min. bei 1000xg ohne



Bremse. Dadurch bildeten sich nach ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennte Banden: oben das verdünnte Patientenplasma, dann eine Schicht mit PBMCs und Thrombozyten. Darunter befand sich das Trennmedium und im Konus die restliche Zellmasse (Abb.13).

Abb.13: PBMC-Isolierung durch Dichtegradientenzentrifugation

Die PBMC-Schichten wurden vorsichtig in allen Röhrchen abgenommen, immer 2 Phasen in ein neues steriles Falcon-Röhrchen gegeben und mit D-PBS-EDTA (500 ml D-PBS w/o Ca/Mg + 5 ml 0,5 M EDTA) auf 50 ml aufgefüllt. Dann wurde für 10 min. bei 530xg und RT zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets ein zweites Mal mit D-PBS-EDTA gewaschen. Alle Zellen wurden in 2 Falcon-Röhrchen vereinigt und zentrifugiert (300xg, 10 min., RT), die Überstände verworfen. Für die nun folgende Erythrozyten-Lyse gab man jeweils 2 ml aqua ad

injectabilia auf die Zellpellets und resuspendierte vorsichtig 30 sek. lang. Es wurden sofort danach 2 ml 1,8 % NaCl-Lösung dazu gegeben und resuspendiert. Gewaschen wurde wieder mit D-PBS-EDTA, 10 min. mit 300xg bei RT zentrifugiert und die Überstände verworfen. Falls das Zellpellet noch eine Rotfärbung aufwies, wurde die Lyse wiederholt. Sonst wurden die Zellen in einem Röhrchen vereinigt, mit D-PBS-EDTA auf 50 ml aufgefüllt, resuspendiert, 10 µl zur Bestimmung der Zellzahl entnommen und zentrifugiert (10 min. mit 300xg bei Raumtemperatur). Die Zellzählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop in der Neubauer Zählkammer. Die Anreicherung der basophilen Granulozyten aus der Population der PBMCs erfolgte mit Hilfe magnetischer Antikörper durch Negativ-Selektion, d.h. durch Depletion der Nicht-Basophilen. Konjugiert mit einem Cocktail verschiedener Hapten-konjugierter Antikörper (gegen CD3, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA und HLA-DR), die mit magnetischen Beads gekoppelt wurden, wurden sie in einer MACS-Säule, die sich im Magnetfeld befand, zurückgehalten, während die basophilen Granulozyten das Magnetfeld passieren konnten.

Für die Negativ-Selektion wurden alle Lösungen gekühlt verwendet, der MACS-Puffer wurde zusätzlich im Ultraschallbad 20 min. entgast. Die Antikörper und Reagenzien für die Basophilen-Aufreinigung sind im Basophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) enthalten. Das Zellpellet wurde mit 300 µl MACS-Puffer versetzt, resuspendiert und in 4 Ansätze aufgeteilt. Jeder Ansatz wurde mit 50 µl FcR Blocking-Reagenz und 100 µl Hapten-Antibody Cocktail versetzt und 15 min. bei 4 °C inkubiert. Dazu wurden jeweils 650 µl MACS-Puffer und 100 µl MACS anti-Hapten MicroBeads gegeben und weitere 20 min. bei 4 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 4 MACS-LS Columns in den MACS Cell Separator eingesetzt und mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspensionen wurden auf die Säulen gegeben und die Basophilen als Negativ-Fraktion aufgefangen. Nach viermaligem Spülen der Säulen mit MACS-Puffer wurde zentrifugiert (10 min., 470xg, RT), die Überstände verworfen, die angereicherten basophilen Granulozyten in je 250 µl RPMI complete aufgenommen, vereinigt und gezählt.

3.4.6 Zellcharakterisierung

3.4.6.1 Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung

Basophile können durchflusszytometrisch als CD123 positive (CD123⁺) und BDCA-2 negative (BDCA-2⁻) Fraktion detektiert werden. CD123 wird in hohem Maße von plasmazytoiden dendritischen Zellen und Basophilen exprimiert, BDCA-2 (CD 303) nur von plasmazytoiden dendritischen Zellen.

Ein Aliquot der Zellsuspension mit ca. 2×10^5 Zellen wurde auf 100 μ l verdünnt, mit 20 μ l des FcR Blocking-Reagenzes, 10 μ l anti-CD-123-PE und 10 μ l anti-BDCA-2-FITC versetzt, gemischt und 10 min. bei 4 °C unter Lichtschutz inkubiert. Dann wurde mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen und 10 min. bei 4 °C und 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und der Basophilen-Anteil durch FACS-Messung bestimmt. Zur Bestimmung des Anteils an nekrotischen Zellen wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit ca. 2×10^5 Zellen mit FACS-Puffer auf 300 μ l verdünnt und mit 10 μ l PI-Lösung versetzt.

3.4.6.2 Hämatologische Färbemethoden

Ein gefärbter Blutausschlag ermöglicht die Beurteilung von Leukozyten und Erythrozyten nach Größe, Form und Farbe. Die panoptische Färbung nach Pappenheim (eine Kombination aus May-Grünwald- und Giemsa-Färbung) ist in der Hämatologie als Standardfärbung etabliert (182). Die einzusetzenden Lösungen enthalten Stabilisatoren, Methanol als Fixiermittel und saure und basische Farbstoffe. Basische Farbstoffe wie Methyleneblau bilden in wässriger Lösung aktive Farbstoffanteile mit positiver Ladung und färben Zellbestandteile, die negative Ladung tragen. Saure Farbstoffe wie Eosin zerfallen in wässriger Lösung in aktive Farbstoffanteile mit negativer Ladung und färben positiv geladene Eiweißstrukturen.

Die verschiedenen Bestandteile des Blutes sind unter dem Lichtmikroskop an ihren unterschiedlichen Färbungen zu erkennen (Tab.5).

Zelle/Zellbestandteil	Färbung
Zellkerne	rot-violett
Erythrozyten	rosa-bräunlich
eosinophile Granula	rot-braun
neutrophile Granula	bläulich-rosa
basophile Granula	dunkelblau-violett
Lymphozytenzytoplasma	hellblau
Monozytenzytoplasma	hellblau
Thrombozyten	blau mit rotviolettem Innenkörper

Tab.5: Unterschiedliche Färbungen von Zellbestandteilen durch Pappenheim-Färbung

Für die verwendeten Färbungen wurden die Farbreagenzien der Firma Niepötter Labortechnik, Bürstadt verwendet. An den Rand eines sauberen, fettfreien Objektträgers wurde 1 kleiner Tropfen EDTA-Vollblut pipettiert. Mit der schmalen Kante eines zweiten Objektträgers oder Deckgläschens wurde das Blut über die Glasfläche möglichst gleichmäßig ausgestrichen, so dass das Blut zum Ende hin ausgedünnt wird. Dadurch sollen die Blutzellen in diesem Bereich möglichst einzeln liegen und können so später besser beurteilt werden. Nach dem Trocknen wurde der Objektträger wie folgt in die Färbelösungen getaucht:

1. Fixierlösung, 8 x 1 sek.
2. Farbstofflösung rot, 4 x 1 sek.
3. Farbstofflösung blau, 4 x 1 sek.
4. aqua dest., 3 sek. (schwenken)

Zwischen den Schritten wurde überschüssige Lösung durch Abfließen auf einem Kleenex-Tuch entfernt. Nach ungefähr einer Stunde konnte der getrocknete Objektträger lichtmikroskopisch untersucht und fotografiert werden (Leica DMRB mit PCO 12 bit CCD Kamera).

3.4.7 Stimulation der angereicherten basophilen Granulozyten

Nach der Aufreinigung wurden die Zellen in RPMI complete auf die gewünschte Konzentration eingestellt (Tab.6). Im Inkubator wurde in sterilen 48-Well-Flachbodenplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ 2 Stunden in Anwesenheit von polyzyklischen Aromaten vorstimuliert und danach 45 min. mit rBet v 1 inkubiert. Zu

gleichen Bedingungen wurden entsprechende Medium- und Lösungsmittelkontrollen mitgeführt.

Zelldichte	500.000/ml
Benzo[a]pyren	0,1-5 μ M
Phenanthren	0,1-5 μ M
1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	0,1-5 μ M
9,10-Diacetoxy-Phenanthren	0,1-5 μ M
Dimethylsulfoxid (DMSO)	< 0,05 %
Ionomycin (Positivkontrolle)	1 μ M
rBet v 1	Probanden-spezifisch; die erforderliche Konzentration, die eine 25-35 %ige CD63-Expression bewirkt, wurde am selben Tag vorher durchflusszytometrisch bestimmt
im Medium: IL-3	0,016 μ g/ml

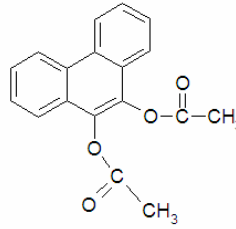
Tab.6: Basophilenstimulation

Im Anschluss wurde die Platte zentrifugiert (300xg, RT), die Überstände abgenommen und diese bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

3.4.8 Charakterisierung von 9,10-Diacetoxy-Phenanthren und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon

Die beiden Substanzen wurden von PD Dr. Albrecht Seidel vom Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. Gernot Grimmer-Stiftung, in Großhansdorf synthetisiert. Phenanthren-9,10-Hydrochinon wurde als 9,10-Diacetoxy-Phenanthren erworben und als solches in die Versuche eingesetzt. Die Acetylgruppen schützen die oxidationsempfindlichen OH-Gruppen. Durch intrazelluläre Esterasen werden sie bei der Stimulation der Zellen abgespalten und die OH-Gruppen des Hydrochinons demaskiert (208). Zur Charakterisierung und Bestätigung der Reinheit der beiden Substanzen wurden im Biochemischen Institut für Umweltcarcinogene UV-Spektren angefertigt und eine HPLC-Analyse durchgeführt (Abb. 36-39).

9,10-Diacetoxy-phenanthren



UV-Spektrum:

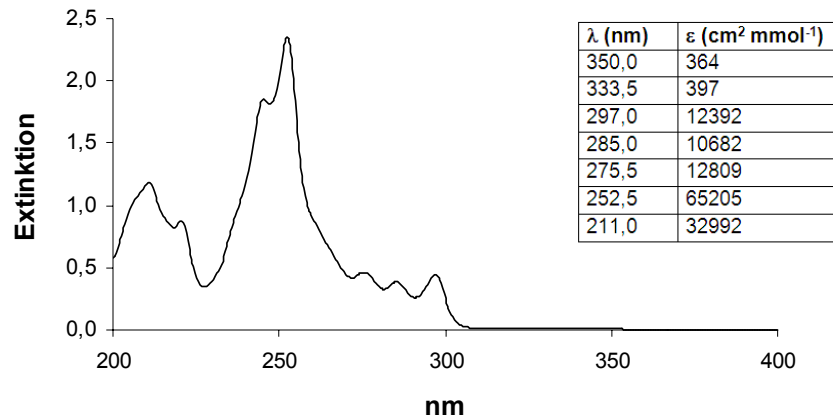
Eingesetzt wurde eine Konzentration von $c = 3,598 \times 10^{-5}$ mmol/ml in Methanol.

Abb.14: UV-Spektrum 9,10-Diacetoxy-Phenanthren (in Methanol)

HPLC-Chromatogramm:

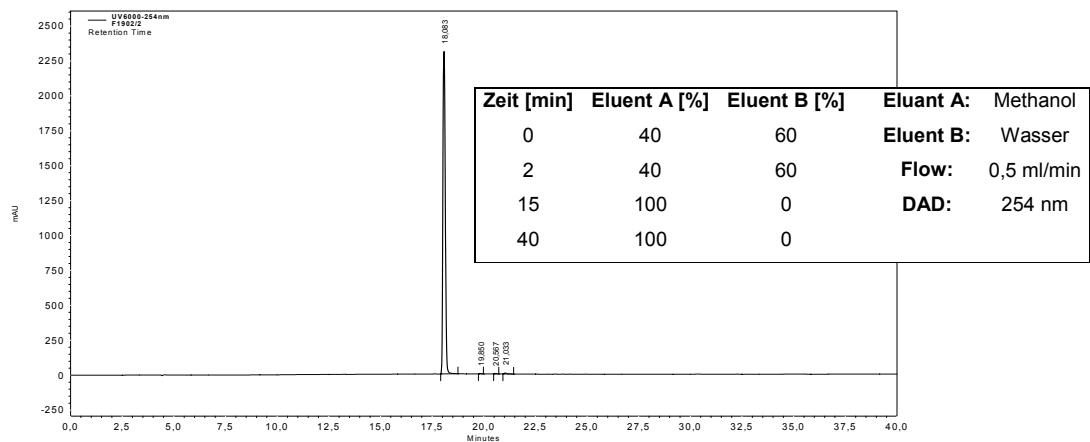
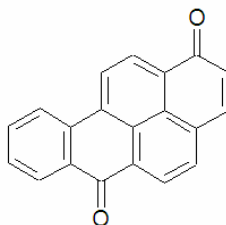


Abb.15: HPLC-Chromatogramm 9,10-Diacetoxy-Phenanthren

1,6-Benzo[a]pyren-Chinon



UV - Spektrum:

Eingesetzt wurde eine Konzentration von $c = 3,78888 \times 10^{-5}$ mmol/ml in Methanol.

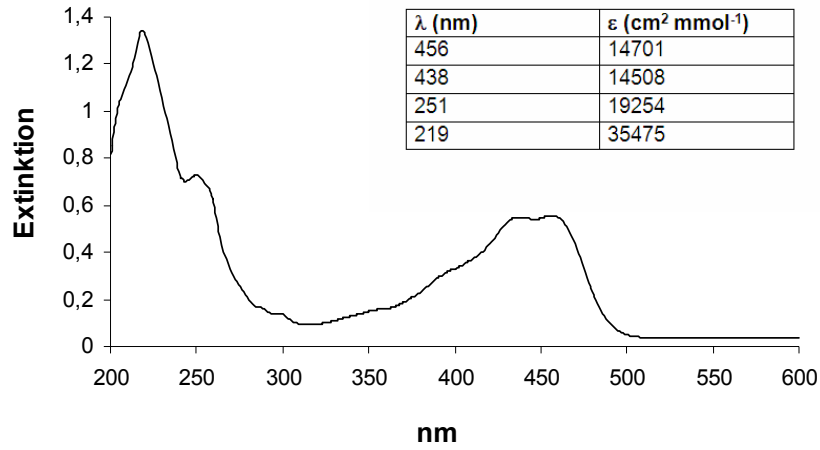


Abb.16: UV-Spektrum 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon (in Methanol)

HPLC-Chromatogramm:

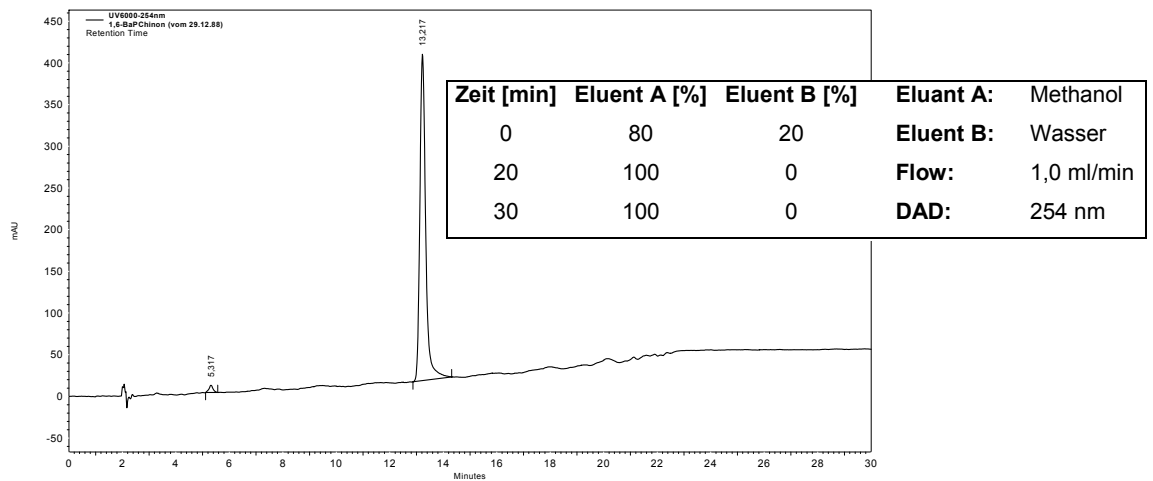


Abb.17: HPLC-Chromatogramm 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon

3.4.9 Antikörper-Array

Der simultane Nachweis verschiedener Zytokine im Kulturüberstand der basophilen Granulozyten erfolgte mit Hilfe von Zytokin-Antikörper-Arrays. Dabei handelt es sich um Membranen, auf der verschiedene Antikörper immobilisiert sind. Der Nachweis erfolgt nach dem Prinzip des „Sandwich“-ELISAs. Nach dem Abblocken von freien Protein-Bindungsstellen inkubiert man mit der Antigenlösung, in diesem Fall mit dem Zellkulturüberstand der basophilen Granulozyten. Die gebundenen Zytokine werden mit biotinylierten Antikörpern verknüpft und mit HRP-markiertem Streptavidin konjugiert (Abb.14). Die Detektion gebundener Zielzytokine erfolgt nach enzymatischer Umsetzung eines geeigneten Substrates hochsensitiv mittels Chemilumineszenz.

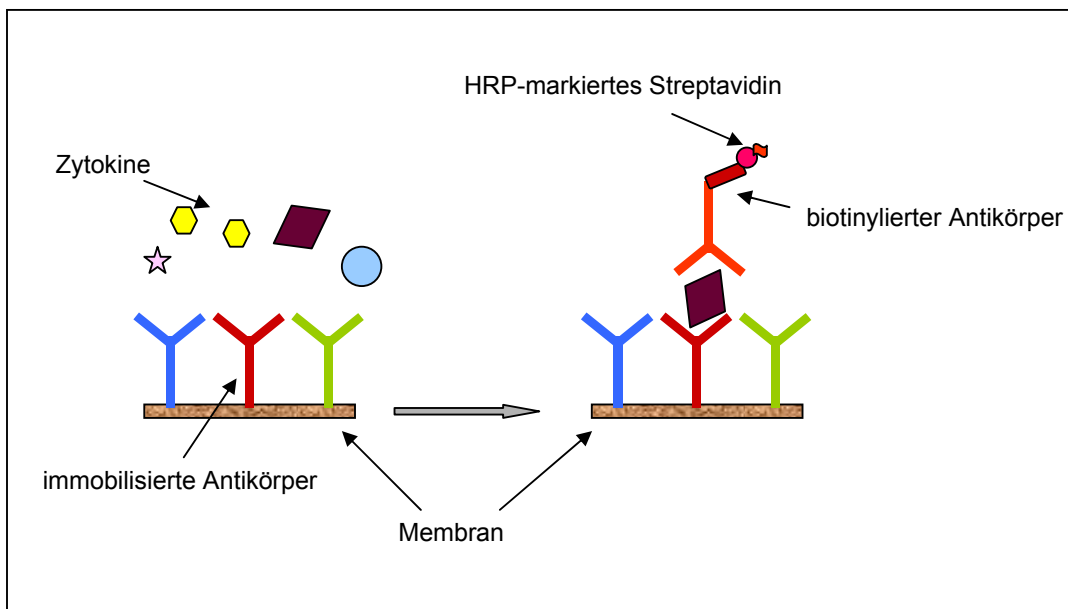


Abb.18: Prinzip des Zytokin-Antikörper-Arrays: Antigene im Zellkulturüberstand binden an immobilisierte Antikörper auf der Membran; die gebundenen Antigene werden mit biotinylierten Antikörpern verknüpft und mit HRP-markiertem Streptavidin konjugiert.

Es wurde mit dem Human Cytokine Antibody Array III (BioCat GmbH, Heidelberg) gearbeitet. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler in langsamer Schwenkbewegung ausgeführt. Die benötigten Membranen wurden mit der Markierung nach oben in einen verschließbaren 8-geteilten Plastikbehälter gelegt und 30 Minuten mit jeweils 2 ml des Blocking Buffer inkubiert. Der Blocking Buffer wurde abgenommen, und es wurde 2 Stunden mit 1 ml unverdünntem

Zellkulturüberstand inkubiert. Die Membranen wurden gemäß den Herstellerangaben gewaschen und dann je 1 ml des mit 100 µl Blocking Buffer verdünnten Biotin-konjugierten Antikörper darauf gegeben. Nach 2 Stunden Inkubation wurde gewaschen und danach 2 ml der HRP-konjugierten Streptavidin-Lösung auf die Membranen pipettiert. Nach 2 weiteren Stunden und einem Waschschrift wurde innerhalb von 40 Minuten unter Lichtschutz die Detektionsreaktion ausgeführt. Hierfür wurden die benötigten Detektions Puffer gemischt, die Membranen vorsichtig auf Plastikfolie gelegt und 2 Minuten mit der Detektionslösung befeuchtet. Dann wurden sie auf einer neuen, trockene Plastikfolie mit einer weiteren durchsichtigen Folie beklebt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstehen. Im Chemiluminometer (Chemi-Smart 5000, PeqLab, Erlangen, mit Software Chemicapt) wurde nach einer Expositionszeit von 1 bis 30 min. je nach Signalintensität die Lumineszenz ermittelt. Die Auswertung erfolgte mittels ArrayVision™.

3.4.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer Enzym-katalysierten Farbreaktion beruht. Beim sogenannten „Sandwich“-ELISA wird ein *coating*-Antikörper an eine feste Phase gebunden, meist eine 96-Well-Platte. Das in der Probe nachzuweisende Antigen bindet spezifisch an diesen Antikörper. Überflüssige Bestandteile werden durch Waschen entfernt, und der Antikörper-Antigen-Komplex wird an einem weiteren Epitop an einen zweiten, z.B. Biotin-markierten *detection*-Antikörper gekoppelt. Die Menge des gebundenen Antigens wird dann nach Zugabe eines markierten Enzyms mit Hilfe einer Substratlösung ermittelt. Das Substrat wird zu einem Farbstoff reduziert, dessen Intensität photometrisch oder durch Chemilumineszenz ermittelt werden kann. Anhand mitgeführter Standards kann daraus die Konzentration des zu bestimmenden Antigens ermittelt werden, die sich direkt proportional zur Farbintensität verhält.

Für die ELISA-Untersuchungen der Mediatorfreisetzung wurden 500.000 Basophile/ml bei 37 °C und 5% CO₂ 2 Stunden 45 Minuten wie oben beschrieben stimuliert, in An- oder in Abwesenheit von rBet v 1 während der letzten 45 Minuten. Die Zellen wurden nach der Inkubation abzentrifugiert und die Überstände unverdünnt (wenn nicht anders beschrieben) im ELISA eingesetzt.

3.4.10.1 Interleukin-4 ELISA

Es wurde mit dem Human IL-4 Quantikine HS (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) gearbeitet. Hier wird in der ersten Enzymreaktion durch an den *detection*-Antikörper gebundene alkalische Phosphatase NADPH zu NADH dephosphoryliert. NADH dient als spezifischer Kofaktor einer zweiten Enzymreaktion. Hierbei wird, katalysiert durch Diaphorase, das Salz Iodonitrotetrazolium Violett zu einem gefärbten Formazan-Farbstoff reduziert, dessen Intensität photometrisch gemessen werden kann. Die minimale detektierbare IL-4-Konzentration liegt bei 0,1 pg/ml.

Der ELISA wurde mit 200 µl Standard oder unverdünnter Probe (Zellkulturüberstand) nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Farbreaktion wurde bei 490 nm im Photometer (MRX Revelation, Thermo Labsystems, Waltham, MA, USA) detektiert.

3.4.10.2 Interleukin-8 ELISA

Es wurde mit dem Human IL-8 QuantiGlo Chemiluminescent ELISA (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) gearbeitet. Das Prinzip ist die Umsetzung eines Luminol/Peroxid-Substrates, wodurch Chemilumineszenz auftritt. Die minimale detektierbare IL-8-Konzentration liegt bei 0,3 pg/ml.

Der IL-8-ELISA wurde mit 50 µl Standard oder unverdünnter Probe (Zellkulturüberstand) nach den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Intensität der abgegebenen Chemilumineszenz wurde im Lumineszenz-Platten-Reader (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg) detektiert.

3.4.10.3 Histamin-ELISA

Es wurde mit dem Histamin ELISA IM2015 (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) gearbeitet. Dieser ELISA-Test ist ein kompetitiver ELISA, das heißt, das Antigen der Probe konkurriert mit einem Enzym-markierten Antigen ähnlicher oder gleicher Struktur (in diesem Fall konkurriert Histamin mit Histamin-alkalische Phosphatase),

welches ebenfalls an den *coating*-Antikörper bindet. Die gebundene alkalische Phosphatase katalysiert eine Farbreaktion, deren Intensität sich indirekt proportional zur Analytkonzentration verhält: je höher die Histaminkonzentration in der Probe ist, desto geringer ist die gemessene Farbintensität. Die Sensitivität des Assays liegt bei 0,5 nM Histamin.

Vor dem ELISA-Test wurden sowohl die Proben als auch die Standards und Kontrollen einer Azylierungsreaktion unterzogen: 25 µl Azylierungsreagenz wurden mit 100 µl Probe/Standard/Kontrolle und 25 µl Azylierungspuffer zusammenpipettiert und sofort gut gemischt. Davon wurden 50 µl in die entsprechenden Wells vorgelegt und 200 µl Histamin-alkalische Phosphatase-Konjugat dazugegeben. Nach Herstellerangaben wurde weiter verfahren. Die Platte wurde bei 405 nm im Photometer vermessen.

Um die maximale Histamin-Freisetzungsfähigkeit der Basophilen zu untersuchen, wurden die Zellen mit Triton X-100 behandelt. Triton X ist ein nichtionisches Detergenz, welches die Zellmembran lysiert, ohne Proteine zu denaturieren. 500 µl einer 0,1 %igen Lösung von Triton-X in aqua dest. wurden auf 250.000 Zellen gegeben, 30 sek. gevortext und die Zellen 1 min. bei 14000 rpm in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert. Die zellfreie Lösung wurde abgenommen und wie oben im ELISA vermessen.

3.4.10.4 Tryptase-Assay

Die Konzentration an α - und β -Tryptase wurde mit Hilfe des ImmunoCAP™ Tryptase Fluoroenzym-Immunoassays (Phadia AB, Uppsala, Schweden) bestimmt. Hierbei reagiert die Tryptase in den Zellkulturüberständen mit anti-Tryptase-Antikörpern, die auf einer festen Oberfläche kovalent gebunden sind. Nach der Kopplung an β -Galaktosidase-anti-Tryptase werden ungebundene Antikörper abgewaschen und der Komplex wird mit einer Entwicklerlösung inkubiert. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Tryptase-Konzentration in der Probe. Die Nachweisgrenze für Tryptase liegt $< 1,0 \mu\text{g/l}$.

Die Tryptasetestung wird als Routinemethode im Allergie-Labor des Klinikums für Dermatologie und Allergologie am Biederstein durchgeführt. Für die Testung wurden jeweils 100 µl unverdünnte Probe eingesetzt.

3.4.11 Isolierung von humanen neutrophilen Granulozyten

Es wurden 25 ml Vollblut aus der Armvene der Probanden in EDTA-Monovetten entnommen. In ein steriles 50 ml Falcon Polypropylen-Röhrchen wurden nacheinander bei Raumtemperatur vorsichtig jeweils 13 ml Histopaque-1119 (Dichte: 1,119 g/ml bei 25 °C) und Histopaque-1077 (Dichte: 1,077 g/ml bei 25 °C) geschichtet. Darauf gab man langsam 25 ml EDTA-Blut. Bei 750xg wurde 45 min. bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch bildeten sich, aufgetrennt durch ihre unterschiedliche Dichte, folgende Banden: oben das gelbe Plasma, darunter die dünne graue Bande der mononukleären Zellen. Darunter befand die erste Schicht Histopaque, getrennt von der zweiten durch die Bande der Granulozyten. Im Konus befand sich die restliche Zellmasse. Die Granulozyten wurden vorsichtig abgenommen, in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen gegeben und mit D-PBS (w/o Ca/Mg) auf 50 ml aufgefüllt. Bei 400xg und Raumtemperatur wurde 20 min. mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Röhrchen wieder mit D-PBS (w/o Ca/Mg) auf 50 ml aufgefüllt und bei 300xg 10 min. zentrifugiert. Für die nun folgende Erythrozyten-Lyse gab man jeweils 1 ml aqua ad injectabilia auf die Zellpellets und resuspendierte vorsichtig 30 sek lang. Es wurde 1 ml 1,8 % NaCl-Lösung dazugegeben und resuspendiert. Gewaschen wurde wieder mit D-PBS, 10 min. bei 300xg und Raumtemperatur zentrifugiert und die Überstände verworfen. Dann wurde mit D-PBS auf 50 ml aufgefüllt, gut resuspendiert und die Zellen gezählt. Wie oben wurde abzentrifugiert, die Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt und die Zellen mit RPMI complete + 0,5 % BSA auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Die Vitalität wurde mit 0,4 % Trypanblau-Lösung kontrolliert und lag bei ca. 98%.

3.4.12 Migrationsassay

Zur Bestimmung der chemotaktischen Wirkung der Überstände nach der Basophilenstimulation wurde ein Migrationsassay mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden jeweils 100 µl einer Zellsuspension mit 1×10^5 neutrophilen Granulozyten in RPMI complete + 0,5 % BSA in die Transwellschalen eines Zellkulturschaleneinsatzes mit einer Porengröße von 5,0 µm (Corning Incorporated, NY) pipettiert und 600 µl der zu testenden Überstände in die zugehörigen Wells gegeben (Abb.15).

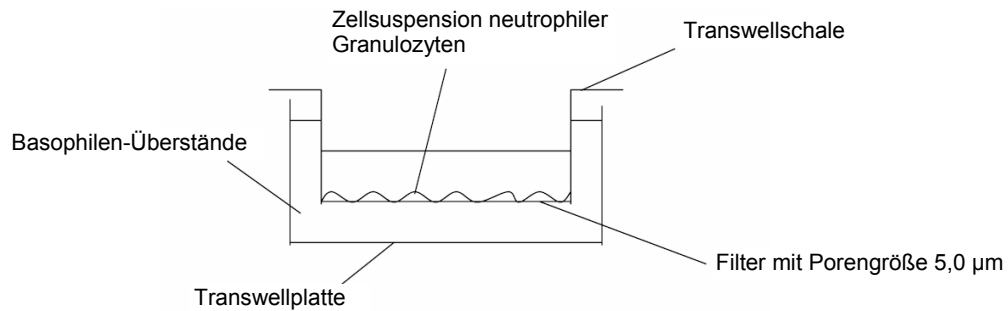


Abb.19: schematische Darstellung des Migrationsassays

Mit Hilfe einer sterilen Pinzette wurden die Schalen in die Wells gesetzt und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert (37 °C und 5 % CO₂). Als Negativkontrolle dienten 600 µl des Mediums, als Positivkontrolle wurden 3,3 x 10⁻⁶ µg/µl Leukotrien B₄ (entspr. 0,01 µM) eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Transwellschalen entfernt, die in die Wells übergegangenen Zellen gut resuspendiert und jeweils 300 µl in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die Anzahl der migrierten Neutrophilen wurde 1 min. lang im Forward-/Side-Scatter durchflusszytometrisch bestimmt.

3.4.13 DNA-Isolierung

Das Prinzip der DNA-Isolierung ist die Lyse der Zellen, die Absorption der stabilisierten Nukleinsäuren an eine Silika-Membran, während die anderen Blutbestandteile entfernt werden.

Den Probanden wurden jeweils ca. 10 ml Vollblut aus der Armvene in EDTA-Monovetten entnommen. Das Blut wurde vorsichtig geschwenkt und nach dem Spin-Protokoll des QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aufgearbeitet. Erhaltene genomische DNA wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.14 Genotypisierung der Probanden

3.4.14.1 *GSTP1* mittels Real-Time-PCR

In der Real-Time-PCR wird das relevante DNA-Stück mit genspezifischen Primern amplifiziert. Im Assay (Applied Biosystems, Foster City, USA) befinden sich neben den Primern zwei TaqMan™ PCR-Sonden, welche als Probes bezeichnet werden. Sie bestehen aus einem am 5'Ende der DNA lokalisierten Reporter-Farbstoff und

sind über ein Linker-Arm-Nucleotide (LAN) am 3'Ende der DNA an einen Quencher gekoppelt. Der Quencher emittiert im Falle des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) spezifische Sonden im nicht sichtbaren Bereich und ist somit farblos. Die Aufgabe des Quenchers liegt darin, Energie, welche vom Reporter übertragen wird, aufzunehmen. Dieses Prinzip wird als FRET (Floureszenz Resonanz Energie Transfer) bezeichnet. Wird der Reporterfarbstoff mit der geeigneten Wellenlänge angeregt und liegt der Quencher (TAMRA, 6-Carboxymethyl-Rhodamin) in unmittelbarer Nähe des Reporters, erfolgt der Energietransfer auf den Quencher und es wird Energie der Wellenlänge des Quenchers emittiert.

Die Probes hybridisieren spezifisch an den DNA-Bereich, in welchem der Polymorphismus liegt. Idealerweise liegt dieser in der Mitte der Sonde. Die beiden Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (6-Carboxy-Fluoreszein = FAM und 6-Carboxy- Rhodamin = VIC) markiert, damit eine Detektion der verschiedenen Allele möglich ist. Im Falle des Polymorphismus im *GSTP1*- Gen liegt ein Basenaustausch im Codon ATC nach GTC vor und somit eine Mutation von Isoleucin nach Valin, kurz: I105V (103, Abb.16).

```

1 ggagtttgcg cgcgcagtc ttcgccacca tgccgccta caccgtggc tatttcccag
61 ttcgaggccg ctgcgcggcc ctgcgcatgc tgctggcaga tcagggccag agctggaag
121 aggaggtggt gaccgtggag acgtggcagg agggctcact caaagcctcc tgcctatacg
181 ggcagctccc caagtccag gacggagacc tcaccctgta ccagtccaat accatcctgc
241 gtcacctggg ccgcaccctt gggctctatg ggaaggacca gcaggaggca gccttggtg
301 acatggtgaa tgacggcgtg gaggacctcc gctgcaaata catccctc atctacacca
361 actatgaggc gggcaaggat gactatgtga aggcactgcc cgggcaactg aagcctttg
421 agaccctgct gtcccagaac caggaggca agacctcat tgtgggagac cagatctcct
481 tcgctgacta caacctgctg gacttgctgc tgatccatga gtcctagcc cctggctgcc
541 tggatgctt cccctgctc tcagcatatg tggggcgct cagcgcccg cccaagctca
601 aggccttctt ggcctcccct gactacgtga acctcccat caatggcaac gggaaacagt
661 gagggttggg gggactctga gcgggaggca gagttgcct tccttctcc aggaccaata
721 aaattctaa gagagct

```

Abb.20: Gensequenz des *GSTP1* Gens

Die Sonde für das G-Allel ist an den Farbstoff VIC gekoppelt und die Sonde für das Wildtyp A-Allel an FAM. Trägt ein Individuum nur eines der beiden Allele, wird nur ein Fluoreszenzsignal detektiert. Zwar können beide Sonden an die Region hybridisieren, doch hat die Punktmutation einen destabilisierenden Effekt auf die nicht passende Sonde, weshalb diese durch die AmpliTaqGold-Polymerase vom Template (DNA-Matrize) verdrängt wird. Die Sonde mit dem passenden Nukleotid hybridisiert korrekt und der Quencher TAMRA wird durch die 5'-3' Exonuklease Aktivität der Polymerase hydrolysiert. Die Energie des Reporters wird nicht mehr auf

den Quencher übertragen, sondern als typisches Emissionsspektrum detektiert. Ist ein Individuum heterozygot, trägt es beide Allele. Es können beide Sonden binden und zwei verschiedene Spektren gemessen werden.

Für die Genotypisierung des *GSTP1*-Polymorphismus der Patienten wurde die DNA auf 1 ng/µl verdünnt. Im Reaktionsansatz wurden 10 µl eingesetzt werden, was einer Konzentration von 10 ng genomischer DNA entspricht. Für die RT - PCR wurde der Taq Man® SNP Genotyping Assay *GSTP1* und der Taq Man® Universal PCR Master Mix (beides Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet (Abb.17).

Master Mix für 1 Probe:

TaqMan® Puffer	25,0 µl
TaqMan® Primer	2,5 µl
H ₂ O	12,5 µl
	40,0 µl

Alle Proben wurden in Triplets angesetzt.

PCR:

- Zyklen: 40
- Volumen: 50µl
- Real-Time-PCR: ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, USA

2' 50 °C
 10' 95 °C
 15'' 95 °C } 40 x
 1' 60 °C

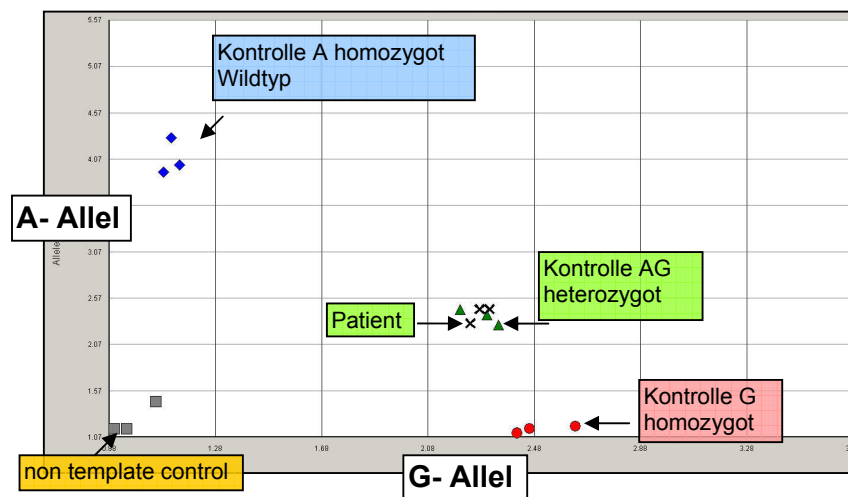


Abb.21 : Beispiel für die allelische Diskriminierung des *GSTP1*- Polymorphismus mit homozygot AA- Allel, homozygot GG- Allel und heterozygot AG- Allel (Kontrollen), Genotyp *GSTP1* des Patienten: heterozygot

3.4.14.2 *GSTM1* und *GSTT1* mittels PCR

Die *GSTM1* ist polymorph im Menschen exprimiert. Beschrieben werden die Allele *GSTM1* *A und *GSTM1* *B, die sich nur hinsichtlich eines K172N Aminosäureaustausches unterscheiden und ansonsten funktionell identisch zu sein scheinen. Der *GSTM1*-Null-Genotyp ist das Resultat der Deletion des *GSTM1*-Gens und resultiert in einem fehlenden funktionalen *GSTM1*-Enzym (sog. Null-Genotypen). Ebenso wie bei der *GSTM1* existiert auch für die *GSTT1* ein gängiges Allel, dessen Expression kein funktionales Enzym zur Folge hat (214).

Die PCR und die Auswertung mittels Gelelektrophorese wurden von Herrn Dr. Klopp aus der AG „Genetische Epidemiologie“ (Leitung: Dr. Thomas Illig) am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg durchgeführt.

Ansatz für 1 Probe:

dNTPs (2mM)	2,0 µl
Puffer (10x)	2,0 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	0,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
DNA (versch. Verdünnungen)	1,0 µl
<u>H₂O</u>	<u>12,6µl</u>
	20,0µl

PCR:

- Zyklen: 35
- Volumen: 20µl
- Thermo Cycler: 4-bay high throughput Thermal Cycler, Biorad, Hercules, CA, USA

15'	95 °C	
45''	95 °C	} 35 x
45''	64 °C	
45''	72 °C	
10'	72 °C	

Primer-Sequenz:

GSTM1:

Primer forward: CTGCCCTACTTGATTGATGGG

Primer reverse: CTGGATTGTAGCAGATCATGC

GSTT1:

Primer forward: TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC

Primer reverse: TCACCGGATCATGGCCAGCA

Für die Gelelektrophorese wurde 1 %iges Agarosegel (in TBE-Puffer) in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid zugegeben. Das warme Gel wird in einen Schlitten mit Kamm gegossen. Der Kamm wird nach dem Abkühlen herausgezogen, wodurch Taschen zum Auftragen der Probe im Gel entstanden. Das abgekühlte Gel wurde daraufhin in einer Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer bedeckt. Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde eine DNA-Leiter mit definiertem Bandenmuster aufgetragen, was später die Größenordnung der Proben-Banden ermöglicht. Bei angelegter Spannung wandert die DNA im elektrischen Feld und wird nach Größe aufgetrennt. Die im Auftragspuffer enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol ermöglichen das Beobachten des Fortschrittes der Auftrennung. In einer UV-Kammer wurde nach Beendigung der Elektrophorese anschließend das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von 254 nm angeregt. Die resultierende Fluoreszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich konnte mittels einer Kamera aufgenommen werden.

3.2.15 Statistik

Um Unterschiede in der CD63-Expression oder der Mediatorfreisetzung durch Inkubation mit PAKs gegenüber DMSO-behandelten Kontrollen beurteilen zu können, wurde der gepaarte „Student's“ t-Test eingesetzt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von PAKs auf die CD63-Expression auf basophilen Granulozyten

4.1.1 rBet v 1-induzierte CD63-Expression

Die Antigen-induzierte Basophilenaktivierung wurde mit Hilfe des Basotests[®] (Orpegen Pharma, Heidelberg) bestimmt, bei dem die Regulation der CD63-Expression auf der Oberfläche der Basophilen im Vollblut als Maß für die Zellaktivierung durchflusszytometrisch ermittelt wird. Die mit IL-3 vorstimulierten Zellen von 12 Birkenpollenallergikern wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,001 bis 4500 ng/ml mit rBet v 1 inkubiert und mit anti-IgE-PE und anti-gp53-FITC gefärbt. Alle getesteten Patienten zeigten eine Dosis-abhängige CD63-Expression bei Inkubation mit rBet v 1 (Abb.18), bei basophilen Granulozyten der Kontrollpersonen ohne Birkenpollenallergie konnte dagegen keine Aktivierung festgestellt werden.

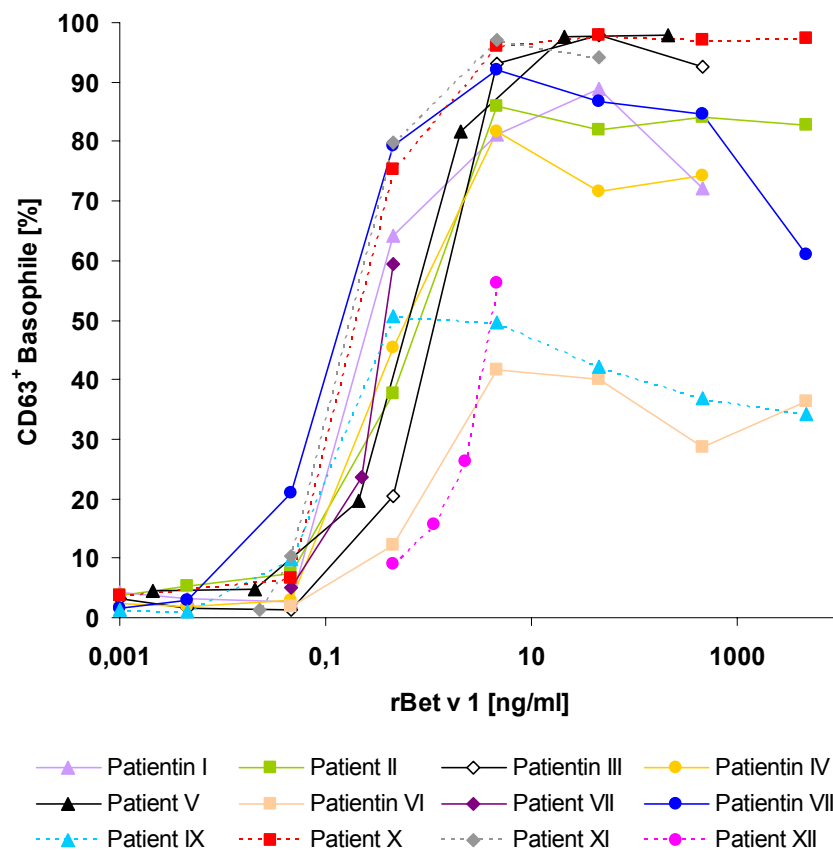


Abb.22: Dosis-Wirkungsbeziehung der rBet v 1-induzierten CD63-Expression der 12 Birkenpollenallergiker (Durchflusszytometrie, Färbung mit anti-IgE-PE und anti-gp53-FITC)

4.1.2 Effekte des EPA-Standards auf die rBet v 1-induzierte CD63-Expression

Um die Effekte von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf die Antigen-induzierte Basophilenaktivierung zu untersuchen, wurde das Gemisch der 16 EPA-PAKs in einer Konzentration von $7,27 \times 10^{-4}$ bis 727 ng/ml in den Basophilenaktivierungstest eingesetzt. Die einzusetzende rBet v 1- Konzentration wurde vorher getestet, um eine allein durch das Antigen induzierte Basophilen-Aktivierung von ca. 15 - 30 % zu erreichen. Mit Ausnahme von Patientin VI (45,45 ng/ml) erwies sich bei allen getesteten Patienten eine rBet v 1 - Konzentration von 0,18 - 0,36 ng/ml als hierfür geeignet. Mitgeführt wurden Negativkontrollen (PBS), fMLP-Positivkontrollen, DMSO-Lösungsmittelkontrollen und Proben nur mit rBet v 1 ohne PAKs.

Verdeutlicht werden sollen die FACS-Ergebnisse am Beispiel eines Probanden. In Abb.19 ist im ersten Fenster im sogenannten „Dot-Plot“ (jede Zelle wird durch einen Punkt abgebildet) das Gate dargestellt, das die PE⁺-Population und damit alle Basophilen filtert. Im zweiten Fenster ist in rosa mit Hilfe eines Histogramms der CD63⁺-Anteil (ca. 17%) der Basophilen aus diesem Gate dargestellt, die mit rBet v 1/DMSO inkubiert wurden. In violett ist der auf 77 % erhöhte Anteil an CD63⁺-Basophilen nach PAK-Inkubation dargestellt.

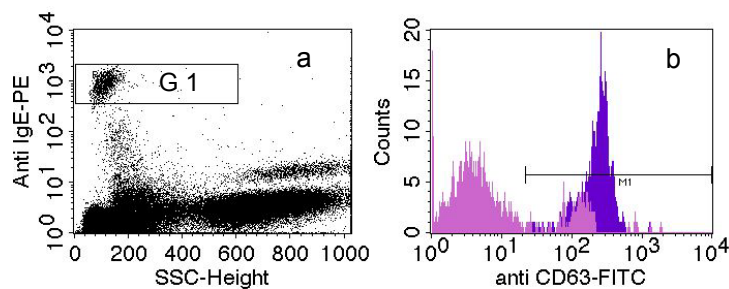


Abb.23: Basophilenaktivierung Probandin III:

- a) Gate G1 der IgE⁺- Population
 b) rosa: CD63⁺-Population bei Inkubation mit rBet v 1 (0,23 ng/ml)/DMSO: ca. 17 % CD63⁺-Basophile
 violett: CD63⁺-Population bei Inkubation mit rBet v 1 (0,23 ng/ml) und dem EPA-PAK-Standard (1,76 ng/ml): ca. 77 % CD63⁺-Basophile

Bei allen 6 getesteten allergischen Probanden wurde eine zum Teil sehr deutliche Erhöhung der rBet v 1 induzierten Basophilenaktivierung durch die Inkubation mit dem EPA-PAK-Standard festgestellt. Die PAK-Konzentration, bei der die jeweils maximale Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt werden konnte, lag zwischen 0,007

und 7,2 ng/ml. Die Effekte traten nur bei Koinkubation mit rBet v 1 auf und bewirkten eine Erhöhung der Basophilenaktivierung bis 95 % (Abb.20). Die geringste Erhöhung der CD63-Expression wurde bei Patientin VI beobachtet, der einzigen Probandin mit *GSTM1*-Wildtyp und *GSTP1* V/V - Genotyp (siehe Punkt 4.4). Von dieser Genkombination wurde gezeigt, dass sie einen protektiven Faktor für den adjuvanten Effekt von Dieselrußpartikeln auf die allergische Immunantwort darstellt (81). Im Gegensatz dazu zeigen die Patienten I bis V mit den Genotypen *GSTM1* 0 bzw. *GSTP1* I/V oder I/I eine erhöhte Anfälligkeit für die modulierende Wirkung der EPA-PAKs im Basophilenaktivierungstest.

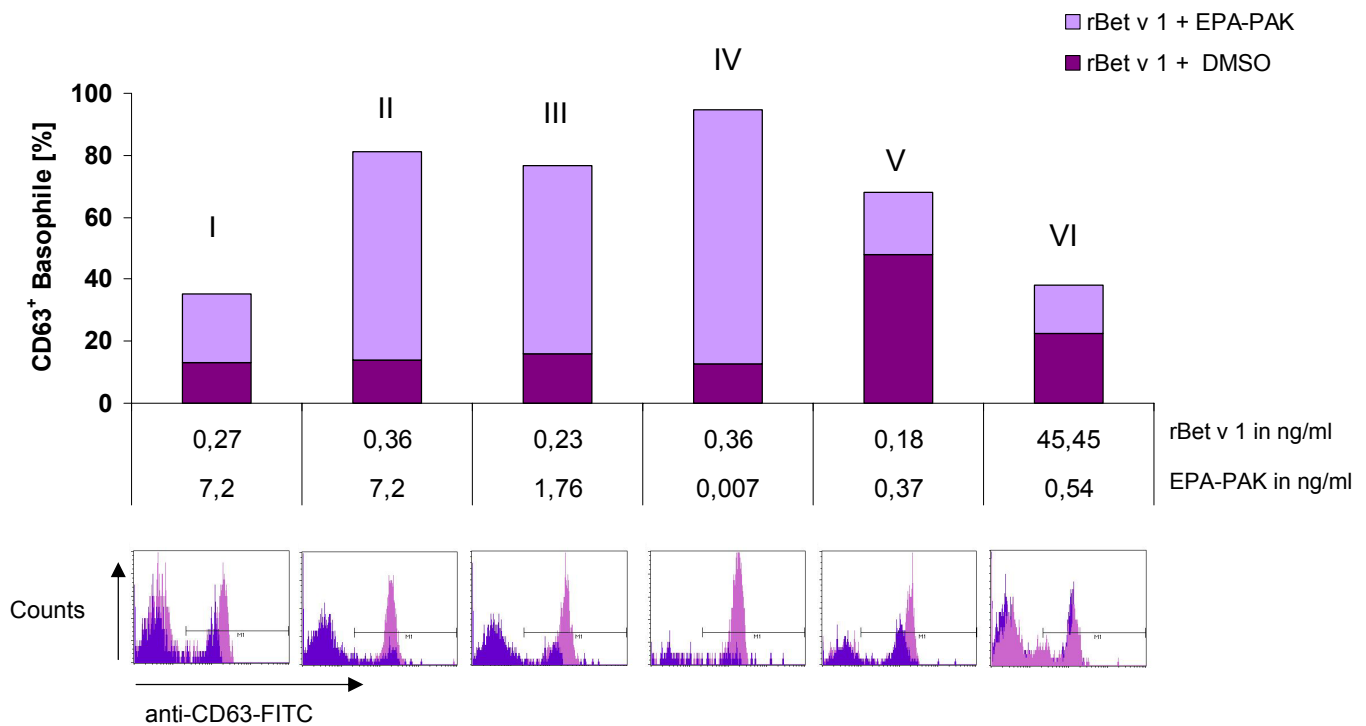


Abb.24: Einfluss von PAKs auf die rBet v 1-induzierte CD63-Expression bei 6 Birkenpollenallergikern. Dargestellt ist die maximale Dosis-Wirkungsbeziehung nach Inkubation mit rBet v 1 und dem EPA-PAK-Standard im Vergleich zur Inkubation mit rBet v 1 und DMSO. Die römischen Ziffern über den Balken benennen den jeweiligen Patienten.

Der PAK-Standard alleine, ohne Allergen, hatte ebenso wie DMSO und PBS keinen Einfluss auf die CD63-Expression. Die DMSO-Konzentration lag stets unter 0,05 %. Die eingesetzten PAK-Konzentrationen bis 727 ng/ml waren nicht toxisch auf die Zellen (keine erhöhte PI-Fluoreszenz). Die Erhöhung der rBet v 1 - induzierten CD63-Expression war im Mittel statistisch signifikant (Abb.21; dargestellt ist die maximale Dosis - Wirkungsbeziehung).

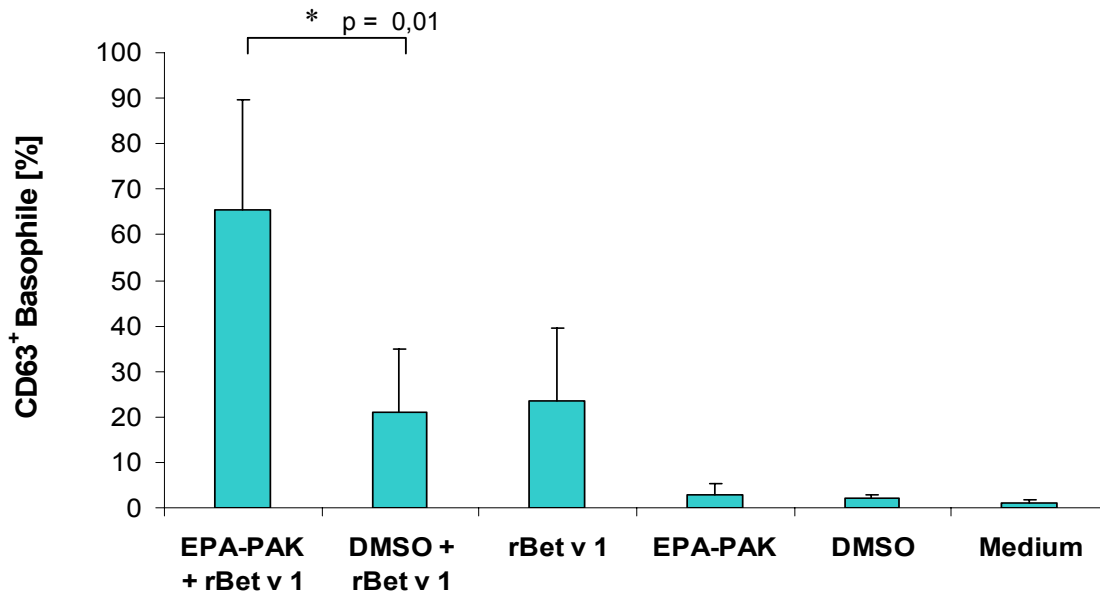


Abb.25: Einfluss des EPA-PAK-Standards und DMSO auf die rBet v 1 induzierte CD63-Expression, maximale Dosis-Wirkungsbeziehung (Mittelwerte aus den Ansätzen von 6 Probanden): der EPA-PAK-Standard erhöht in Verbindung mit rBet v 1 signifikant die Zahl der aktivierten Basophilen

4.1.3 Nichtallergische Kontrollpersonen

Die CD63-Expression der Basophilen aller getesteten gesunden Kontrollprobanden lag mit < 5 % im negativen Bereich und wurde weder durch rBet v 1 noch durch die EPA-PAKs beeinflusst (Abb.22).

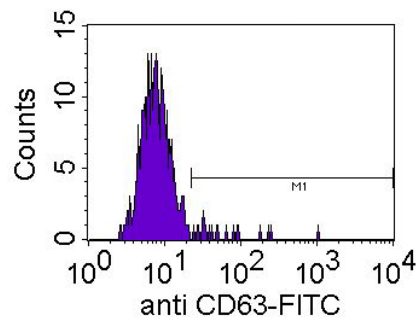


Abb.26: Basophile nichtallergische Kontrollpersonen: keine CD63-Expression nach Inkubation mit rBet v 1 oder EPA-PAKs (Kontrollprobandin 6)

4.1.4 Dosis-Wirkungsbeziehungen

Die Erhöhung der CD63-Expression durch das EPA-PAK-Gemisch folgte einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung, wie in Abb.23 exemplarisch für einen Patienten gezeigt ist. Dargestellt sind zwei Dosis-Wirkungsbeziehungen an zwei unterschiedlichen Tagen. Deutlich wird die unterschiedlich starke Reaktion des Probanden auf den EPA-Standard an verschiedenen Tagen und das Maximum der Dosis-Wirkungsbeziehung bei unterschiedlichen Konzentrationen.

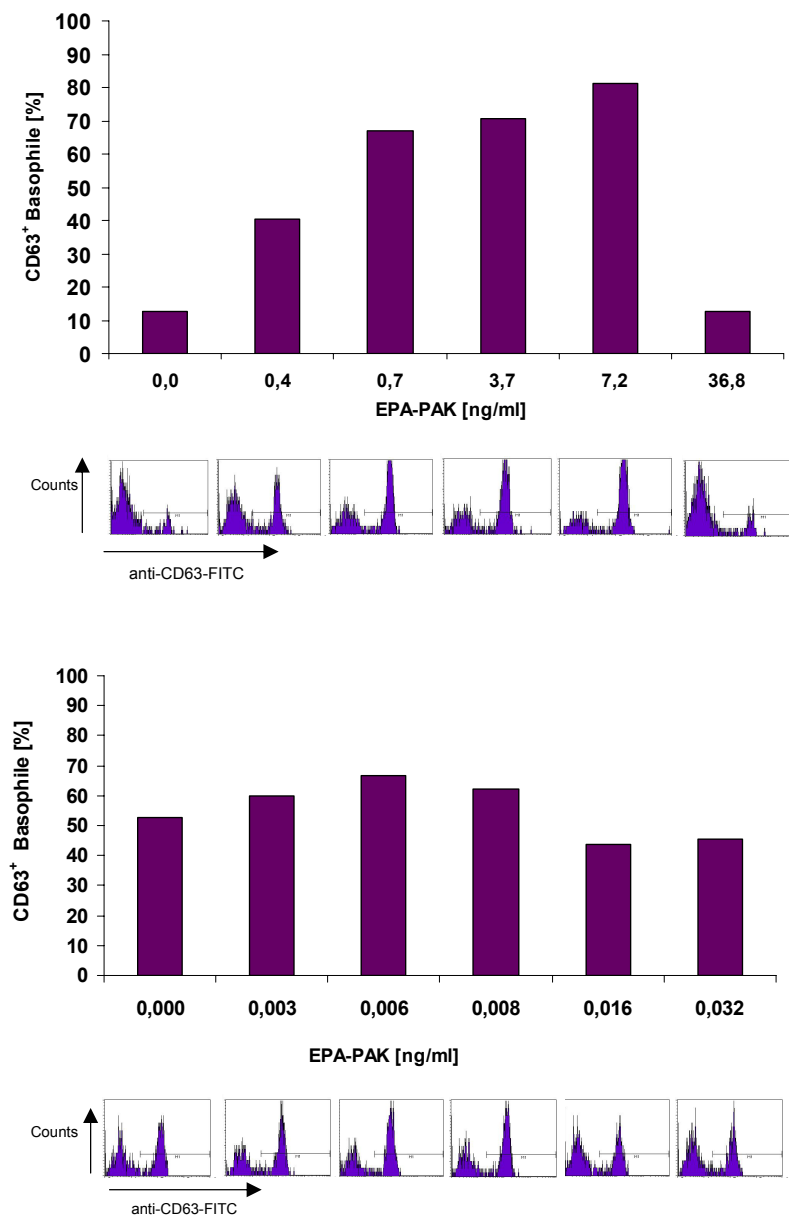


Abb.27: Dosis-Wirkungsbeziehung der Basophilenaktivierung durch den EPA-PAK-Standard an 2 unterschiedlichen Tagen am Beispiel des Patienten II

4.2 Anreicherung humaner basophiler Granulozyten und Zellcharakterisierung

Aus Vollblut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation PBMCs erhalten, aus denen die basophilen Granulozyten in möglichst reiner Form durch Negativ-Selektion isoliert wurden (Abb.24).

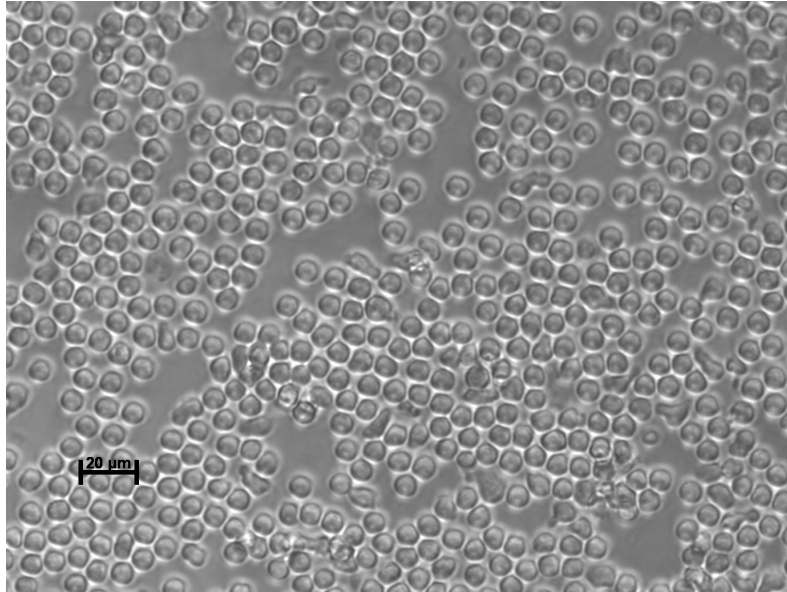
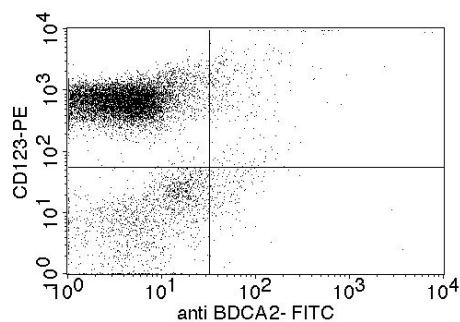


Abb.28: Angereicherte basophile Granulozyten im Lichtmikroskop, Vergrößerung 320x

Der Anteil basophiler Granulozyten wurde durchflusszytometrisch als CD123⁺ und BDCA-2⁻-Fraktion bestimmt (Abb.25). CD123-PE färbt plasmazytoide dendritische Zellen und Basophile, während BDCA-2 in hohem Maße nur auf plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert ist. Der Anteil der Basophilen in der aufgereinigten Zellfraktion betrug in allen Ansätzen zwischen 65 und 95 % (im Durchschnitt 82,4 %).



Quadrant	gezählte Ereignisse	% Zellen
oben links	8158	82
oben rechts	299	3
unten links	1398	14
unten rechts	145	1

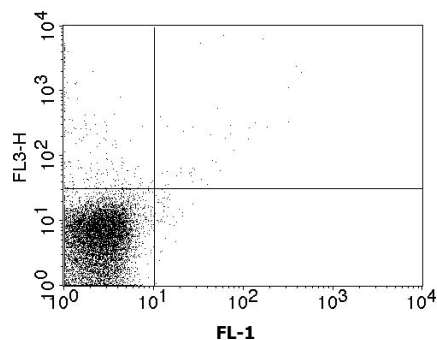
Abb.29: Beispiel für die durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils basophiler Granulozyten nach MACS-Negativselektion aus PBMCs

Außerdem wurden folgende Doppelfärbungen durchgeführt, um andere enthaltene Zelltypen zu erfassen (Tab.7):

Antikörper	spezifisch für	detektiert
CD123-PE (+ BDCA2-FITC)	Basophile	82 %
CD3-FITC (+ CD123-PE)	T-Zellen	4 %
CD19-PE (+ BDCA2-FITC)	B-Zellen	0,2 %
CD61-PE (+ BDCA2-FITC)	Blutplättchen	9 %

Tab.7: Färbungen zur Bestimmung der in der aufgereinigten Fraktion enthaltenen Zelltypen; dargestellt ist Probandin I

Die Anzahl der nekrotischen Zellen wurde nach der Aufreinigung der Zellen sowie nach 165 min. Inkubation mit 1 μ M Phenanthren, Benzo[a]pyren, 9,10-Diacetoxypyrenanthren oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon durch Färbung mit Propidiumjodid (PI) bestimmt. Der Anteil nicht-nekrotischer Zellen war in allen Ansätzen > 90 % (Abb.26). Nur die Inkubation mit 1 μ M 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon führte zu einem erhöhten Anteil PI⁺-Zellen. Deshalb wurde für die folgenden Versuche eine nicht-toxische Konzentration von 0,1 μ M 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon gewählt.



Quadrant	gezählte Ereignisse	% Zellen
oben links	196	2
oben rechts	40	0,5
unten links	9719	97
unten rechts	45	0,5

Abb.30: Bestimmung des Anteils PI⁺- Zellen nach MACS-Säulenaufreinigung von PBMCs, Beispiel Proband II

Zur weiteren Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion wurde die Färbung nach Pappenheim eingesetzt, eine Kombination aus May-Grünwald- und Giemsa-Färbung, bei der die verschiedenen Bestandteile des Blutes je nach positiver oder negativer Ladung der Zellbestandteile mit sauren und basischen Farbstoffen unterschiedlich gefärbt werden. Im Vollblut konnten die verschiedenen Zellen des Blutes identifiziert werden (Abb.27), in der angereicherten Basophilenfraktion nach der MACS-Negativ-Selektion waren andere Zellen als die dunkelblau-violett gefärbten Basophilen kaum zu finden (Abb.28).

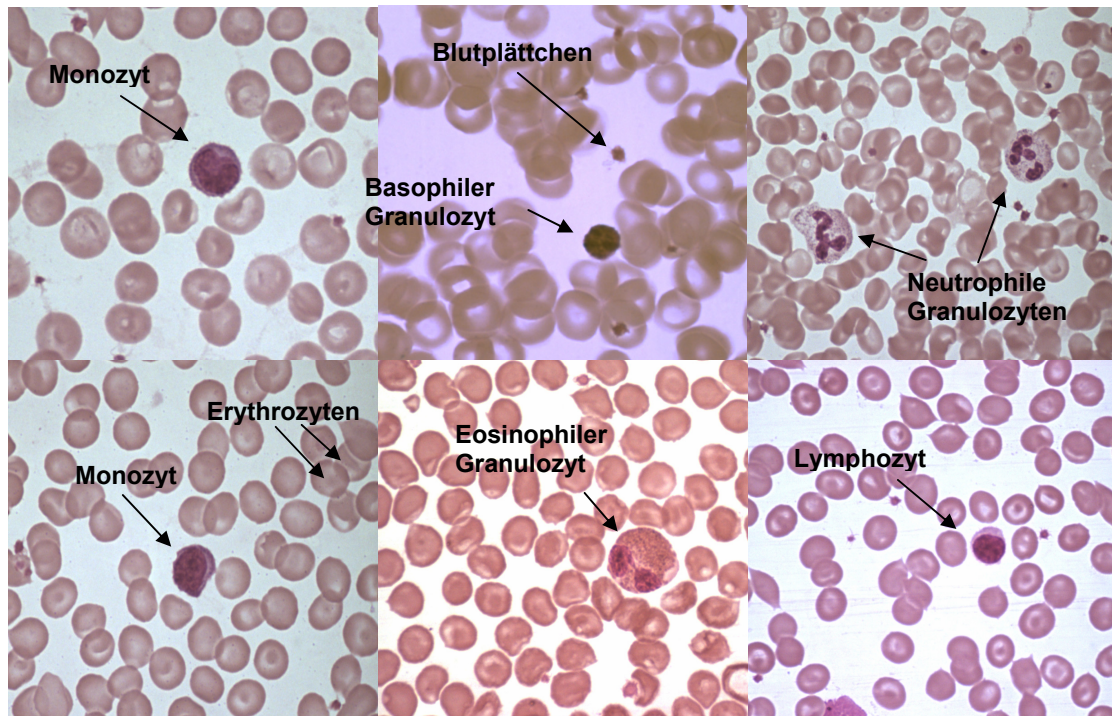


Abb.31: Vollblut: Identifizierung der unterschiedlichen Blutzellen durch Pappenheim-Färbung, Probandin IV (Lichtmikroskop, 630x)

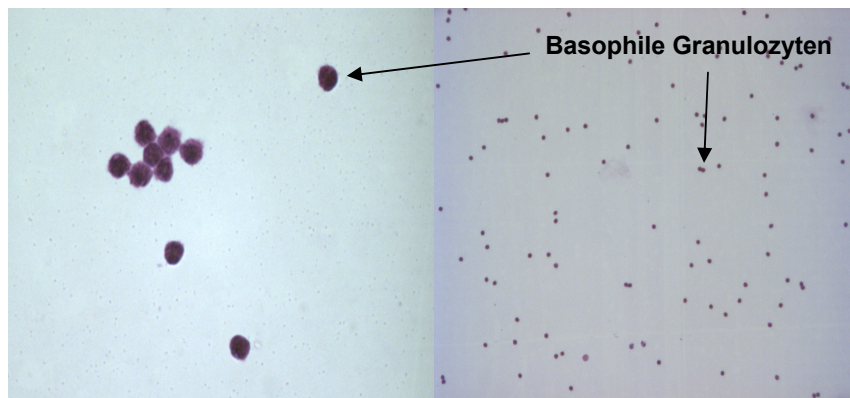


Abb.32: angereicherte Basophilen: Pappenheim-Färbung, Probandin IV (Lichtmikroskop, 630x/200x)

4.3 Einfluss von Einzel-PAKs auf die Mediatorfreisetzung aus aufgereinigten Basophilen

4.3.1 Simultanbestimmung des Zytokin-Expressionsprofils mittels Antikörper-Array

Zum Zwecke eines möglichst breit angelegten Screenings auf verschiedene Zytokine wurden die Basophilen nach der Säulenaufreinigung mit 1 μ M Phenanthren oder 1 μ M Benzo[a]pyren vorstimuliert und danach mit rBet v 1 inkubiert. Die passende rBet v 1-Konzentration wurde durch eine Titration am selben Tag ermittelt und so gewählt, dass im Basotest[®] eine ca. 25 %ige Basophilenaktivierung erreicht wurde. In den einzelnen Zellkulturüberständen wurden verschiedene Zytokine simultan mit Hilfe eines Proteinarrays (Human Cytokine Antibody Array III, BioCat, Heidelberg) nachgewiesen. Bei dieser Methode binden Antigene im Überstand an entsprechende, auf einer Membran immobilisierte Antikörper, wobei jeder Antikörper zweimal auf der Membran aufgebracht ist. Nach der Verknüpfung mit biotinylierten Antikörpern und HRP-Streptavidin werden die Zytokine mittels Chemilumineszenz nachgewiesen und mit ArrayVision[™] bestimmt (Abb.29).

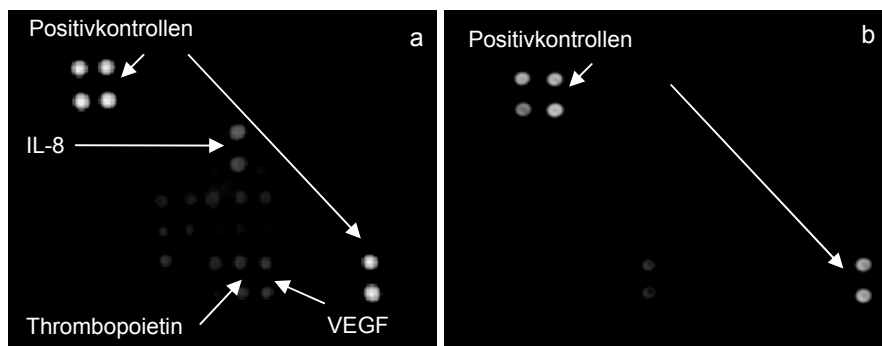


Abb.33: Human Cytokine Antibody Array, exemplarisches Beispiel (Probandin III)

Membran a: Inkubation mit 1 μ M Benzo[a]pyren

Membran b: Negativkontrolle (Medium)

Der Versuch wurde mit 6 Patienten durchgeführt. Die Auswertung der Chemilumineszenzintensitäten führte zu einer Reihe Zytokine, die bei den einzelnen Probanden durch Stimulation mit den PAKs - im Vergleich zur Inkubation nur mit rBet v 1/DMSO - hoch- bzw. runterreguliert wurden. Ausgewählt wurden analog den Herstellerangaben (BioCat, Heidelberg) die Ergebnisse, die im Vergleich zur

Kontrolle um mehr als das 1,3-fache unterschiedlich reguliert waren (Tab.8). Bei 5 von 6 Patienten wurde durch beide PAKs Thrombopoietin (TPO) hochreguliert. TPO ist Hauptstimulator der Blutplättchenbildung. Es ist ein Hormon und der Hauptregulator der Megakaryocytopoese (Plasmareifung, Abschnürung der Blutplättchen). Gebildet wird TPO hauptsächlich in Hepatozyten und Nierenzellen (111). Ebenso auffällig war die Erhöhung von VEGF (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor) bei 4 Patienten durch Phenanthren und Benzo[a]pyren. VEGF induziert unter anderem die Angiogenese (96). Es fanden sich in der Liste der erhaltenen Ergebnisse auch Zytokine mit bekannter Bedeutung in der allergischen Entzündungsreaktion. Benzo[a]pyren verstärkte die IL-13-Freisetzung aus Basophilen zweier Patienten. Bei 3 Patienten wurde durch Phenanthren und bei 2 Patienten durch Benzo[a]pyren die Freisetzung von IL-8 erhöht, bei 2 Patienten die Freisetzung von IL-4. Unter anderem diese Befunde wurden mittels ELISA näher untersucht.

hochregulierte Zytokine												
Patienten												
Proteine	I		III		V		VI		VII		VIII	
	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P
Thrombopoietin	1,8x	1,3x			1,6x	3,4x	3,1x	2,5x	1,6x	2,7x	2,1x	1,3x
VEGF	2,0x	1,3x					2,4x	1,8x	1,8x	4,0x	3,3x	1,4x
PDGF BB	2,7x	1,4x					3,1x	1,9x	1,4x	2,0x		
SDF	2,1x	1,3x					3,1x	3,9x	3,6x	8,2x		
IL-7	1,5x			1,9x	6,1x	2,8x			1,3x	2,4x		
ENA-78	1,6x			3,7x				2,1x	3,6x	3,8x		
MIP 1 δ				2,1x		2,0x	1,7x		5,1x		2,2x	
RANTES	2,1x	1,8x							1,7x	5,1x	1,9x	
Leptin		1,3x					3,5x		1,8x	2,4x	17,8x	
TGF- β	7,0x	5,1x	3,6x					31,4x	270x			
IL-8			1,3x	1,5x	1,6x			1,3x			3,6x	
TNF- β			2,1x	1,5x						2,5x		19,9x
IL-2	1,6x			3,9x			37,5x		3,5x			
IL-10					2,0x		1,7x	2,1x			4,5x	
IL-3					1,7x	1,9x	3,9x	5,5x				
MDC			7,3x	1,4x		1,6x	2,0x					
EGF			3,3x	1,9x			2,1x			2,1x		
IL-15					2,0x	2,1x			1,4x		12,4x	
MCP 1	2,3x			3,0x	1,5x							
TNF- α			2,0x	3,3x						5,4x		
Oncostatin				1,5x						1,8x	5,2x	
IL-4			1,7x	2,3x					1,9x			
Angiogenin				1,5x			2,9x		1,3x			
MCSF									1,6x			2,1x
IL-12p40p70											6,6x	1,4x

Proteine	I		III		V		VI		VII		VIII	
	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P
IL-13				600x				1,8x				
TARC								3,1x	3,0x			
MCP-2					3,2x					3,5x		
IL-6					2,8x	10,3x						
GCSF			621x	292x								
MIG				2,4x						5,0x		
IFN-g								5,2x			50,6x	
IGF-1							1,4x					
IL-1 α												2,5x
IL-1 β											8,5x	
MCP-3										2,6x		
GRO- α			3,5x									
GRO			3,5x									
runterregulierte Zytokine												
Patienten												
Proteine	I		III		V		VI		VII		VIII	
	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P	Phe	B[a]P
MCP-2			4,0x	2,2x			4,1x	4,9x				
MCP-1						1,5x		2,6x				2,44x
SDF			5,4x		2,0x	1,6x						
GRO- α					5,0x	31,7x	10,7x					
IL-2		5,5x				15,6x						2,7x
EGF						1,6x		7,2x	1,6x			
Angiogenin			7,4x			1,7x						
GRO						8,2x					6,0x	
IL-12p40p70				1,9x		4,4x						
IL-13					4,9x		57,2x					
IL-15				3,8x			473x					
IFN- γ		4,2x					6,1x					
TNF- β								2,6x	151,6x			
IL-6									10,7x	2,4x		
GCSF								1,6x		3,5x		
MCSF								1,8x				
MIG								1,7x				
IL-1 β							83x					
PDGF BB			5,7x									
MCP-3				2,5x								
I-309						57,7x						
VEGF			1,9x									
Leptin			11,1x									
SCF							1,6x					
IGF-I												1,6x
IL-1 β		16,2x										
IL-1 α					9,1x							
TNF- α									2,1x			

Tab.8: Ergebnisse Protein-Array mit 6 Probanden. Dargestellt sind nur Ergebnisse, die sich nach Vorstimulation mit 1 μ M Phenanthren oder 1 μ M Benzo[a]pyren und anschließender Koinkubation mit rBet v 1 im Vergleich zur Kontrolle (rBet v 1 + DMSO) um mehr als das 1,3-fache unterscheiden

4.3.2 Freisetzung von IL-4, IL-8, Histamin, Tryptase und IL-13 (ELISA)

500.000 Basophile/ml wurden 165 min. mit 1 μ M Phenanthren, Benzo[a]pyren, 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 μ M 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon stimuliert, mit oder ohne rBet v 1 während der letzten 45 min.

4.3.2.1 Einfluss von Phenanthren und Benzo[a]pyren auf die Mediatorfreisetzung

Freisetzung von Interleukin-4

Bei 11 untersuchten Birkenpollenallergikern wurde die IL-4-Freisetzung durch die Stimulation mit Phenanthren und Benzo[a]pyren im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erhöht. Dargestellt sind die Werte mit (links) oder ohne (rechts) rBet v 1. Benzo[a]pyren und Phenanthren bewirken eine Erhöhung der IL-4-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle auf ca. 135 %. Diese Effekte waren statistisch signifikant (Abb.30). Die Zugabe von rBet v 1 hatte keine weitere Verstärkung dieses Effektes zur Folge. Die durchschnittliche IL-4-Konzentration ohne PAKs lag nach Stimulation mit rBet v 1 bei 4,61 pg/ml (\pm 3,85 pg/ml), in Abwesenheit von Antigen bei 3,52 pg/ml (\pm 2,98 pg/ml).

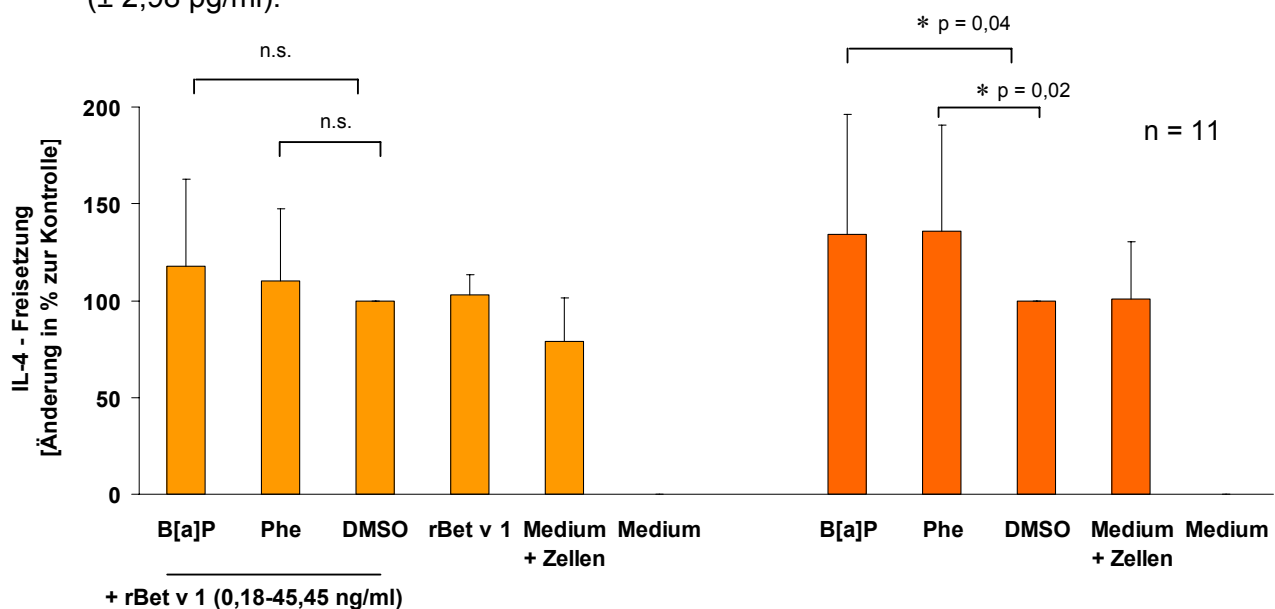


Abb.34: IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ M Phenanthren oder Benzo[a]pyren in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-4-Freisetzung aus den Ansätzen von 11 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (<0,05 %).

Freisetzung von Interleukin-8

Bei 10 untersuchten Birkenpollenallergikern wurde nach der Stimulation mit Phenanthren und Benzo[a]pyren eine signifikante Erhöhung der IL-8-Freisetzung beobachtet, wobei der stärkere Effekt durch Benzo[a]pyren hervorgerufen wurde (Abb.31). B[a]P bewirkte eine Zunahme der IL-8 Freisetzung auf 135 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, durch Phe wurde die IL-8-Freisetzung auf 128 % gesteigert. Die Zugabe von rBet v 1 während der Stimulation bewirkte keine relevante zusätzliche Erhöhung des Effektes. Im Durchschnitt lag die IL-8-Konzentration nach Stimulation mit rBet v 1 bei 77,73 pg/ml ($\pm 103,41$ pg/ml), ohne rBet v 1 bei 68,99 pg/ml ($\pm 104,73$ pg/ml).

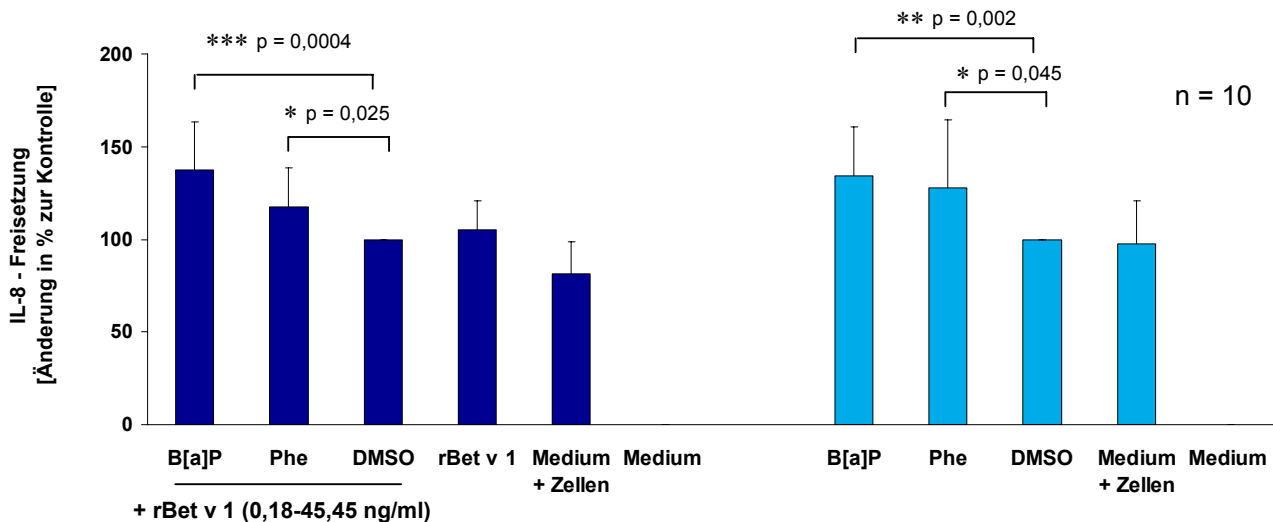


Abb.35: IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ M Phenanthren oder Benzo[a]pyren in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-8-Freisetzung aus den Ansätzen von 10 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle ($< 0,05$ %).

Histamin-Freisetzung

Bei 10 untersuchten Birkenpollenallergikern wurde die Histamin-Freisetzung in Anwesenheit von rBet v 1 durch Phenanthren und Benzo[a]pyren nicht beeinflusst. Wenn allerdings während der letzten 45 Minuten kein Antigen zugegeben wurde, setzten die Zellen, stimuliert durch beide PAKs, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle mehr Histamin frei. Phenanthren erhöhte die Freisetzung von Histamin auf rund 170 % im Vergleich zur Kontrolle. Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant (Abb.32). Im Durchschnitt lag die Histamin-Konzentration ohne Antigen-Zugabe bei

den allergischen Probanden bei 1186 nM (± 757 nM). Sie war mit 2147 nM (± 804 nM) deutlich höher, wenn mit rBet v 1 koinkubiert wurde.

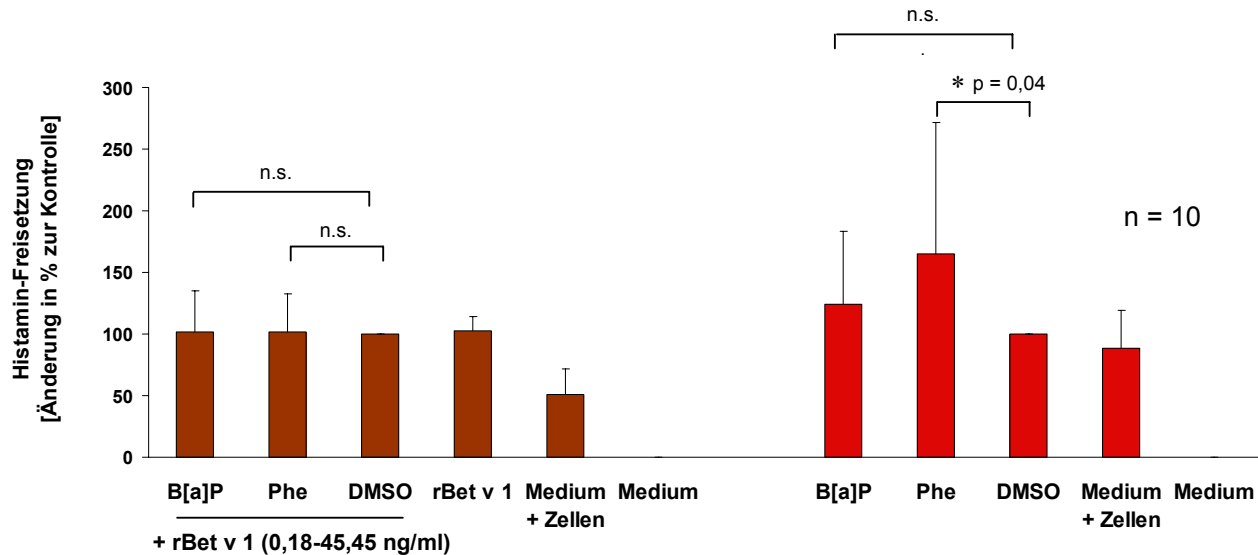


Abb.36: Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ M Phenanthren oder Benzo[a]pyren in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der Histamin-Freisetzung aus den Ansätzen von 10 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle ($< 0,05$ %).

Um die maximale Histamin-Freisetzungsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurde die Zellmembran der Basophilen mit Triton X-100 lysiert. So wurde auch das Histamin gewonnen, welches nach 165 min. nicht ins Medium abgegeben wurde, sondern in den Zellen verblieb (Abb.33). Die Freisetzung von Histamin nach

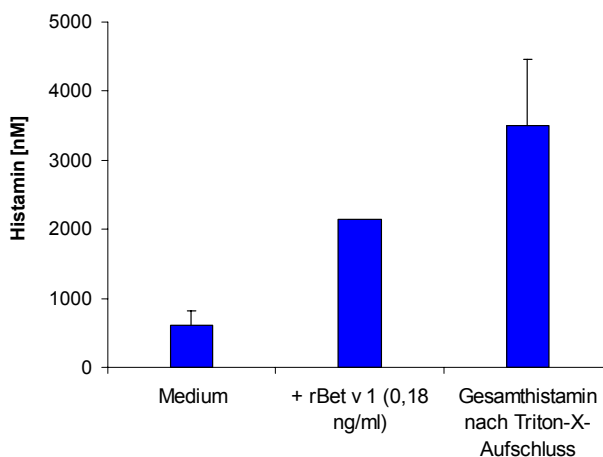


Abb.37: Histamin-Freisetzung nach Aufschluss der Zellen mit Triton-X (Beispiel Proband II)

Inkubation mit einer Menge rBet v1, die eine ca. 25%ige Expression von CD63 bewirkt, beträgt demnach bei dem dargestellten Probanden $\frac{1528}{2904} = 0,526$, also 52,6 % des Gesamthistamins. Die Spontanfreisetzung, also die abgegebene Menge an Histamin ins Medium ohne Zugabe eines Stimulus, lag bei 17,2 %.

Dosis-Wirkungsbeziehungen PAK-induzierten Freisetzung von IL-4, IL-8 und Histamin

Im Bereich 0,1-5 μM Phenanthren/Benzo[a]pyren zeigten die PAK-induzierte IL-4-, IL-8- und Histamin-Freisetzung eine Dosis-Abhängigkeit (Abb.34).

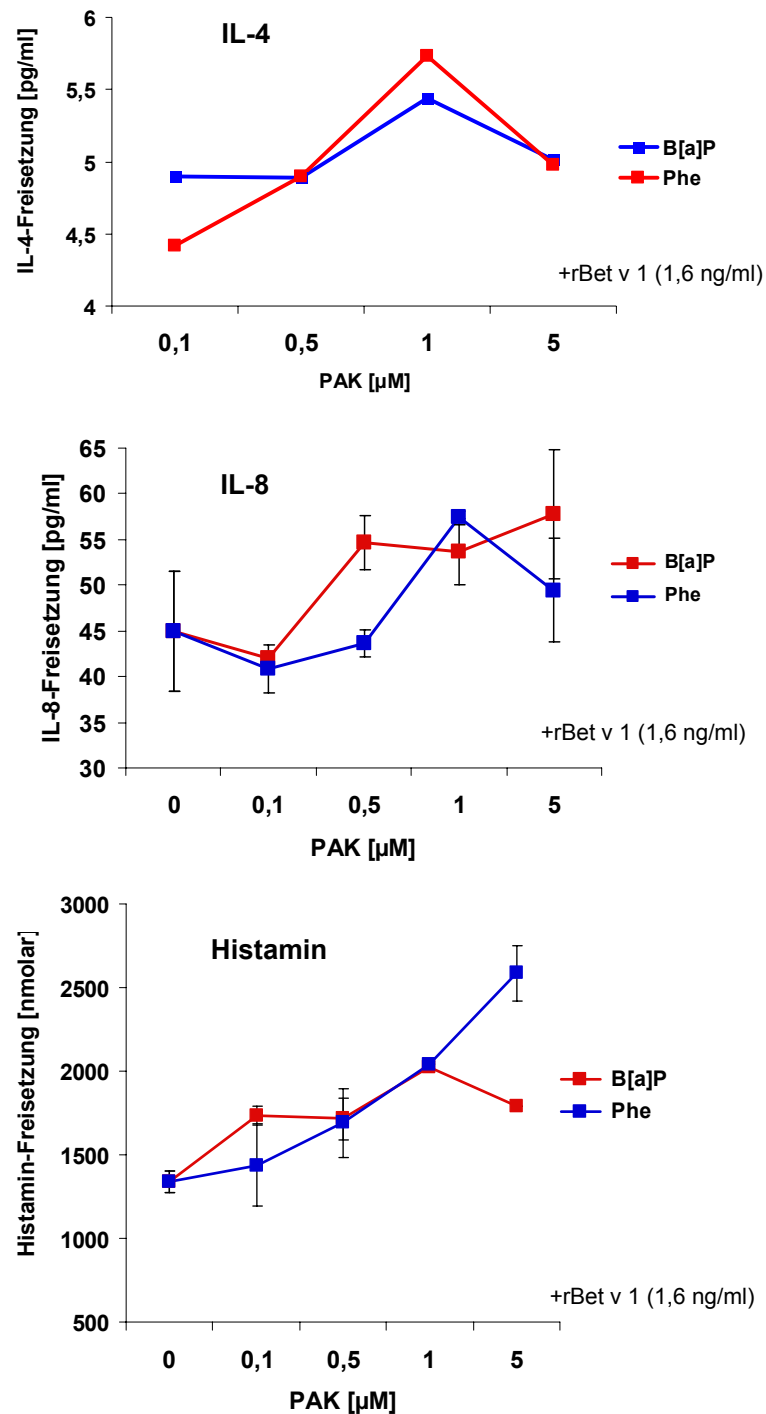


Abb.38.: Dosisabhängige Mediator-Freisetzung durch Benzo[a]pyren und Phenanthren (Beispiel Proband II)

Tryptase-Freisetzung

Die Tryptase-Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde durch Phenanthren und Benzo[a]pyren bei den 8 getesteten Patienten in An- und in Abwesenheit von Antigen auf 111 % bzw. 119 % im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abb.35). Die Ergebnisse für die Koinkubation mit rBet v 1 erwiesen sich dabei als signifikant. Die durchschnittliche Tryptasekonzentration in den Zellkulturüberständen der Allergikerzellen betrug nach Zugabe von Antigen 10,42 µg/l (± 8,98 µg/l), ohne rBet v 1 5,99 µg/l (± 4,79 µg/l).

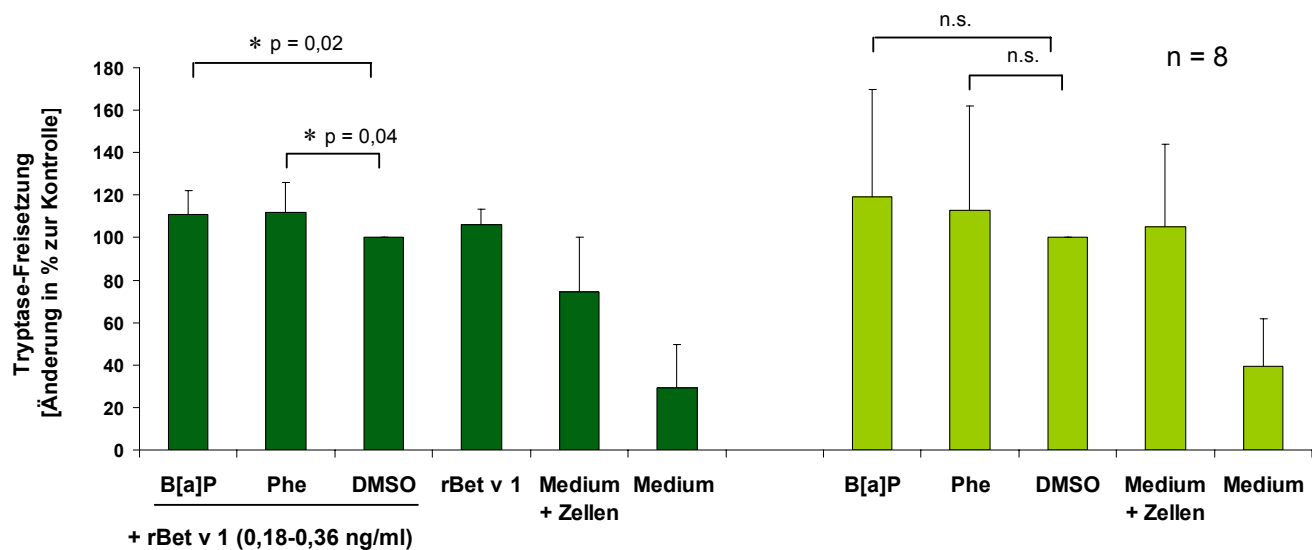


Abb.39: Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM Phenanthren oder Benzo[a]pyren in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tryptase-Freisetzung aus den Ansätzen von 8 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (< 0,05 %).

4.3.2.2 Einfluss von 9,10-Diacetoxy-Phenanthren und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon auf die Mediatorfreisetzung

Mit Phenanthren-9,10-Hydrochinon und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon soll an 2 Derivaten der Mutterkohlenwasserstoffe untersucht werden, ob die Wirkungen von Phenanthren und Benzo[a]pyren auf die Mediatorfreisetzung durch den Einsatz ihrer Metaboliten mit redoxaktivem Potential (72, 142, 208) verstärkt werden.

Freisetzung von IL-4

Die Derivate Phenanthren-9,10-Hydrochinon und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon zeigten nur marginale Effekte auf die Freisetzung von IL-4. Weder die Hemmung der IL-4-Freisetzung durch Phenanthren-9,10-Hydrochinon noch die Erhöhung durch 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon waren statistisch signifikant (Abb.40).

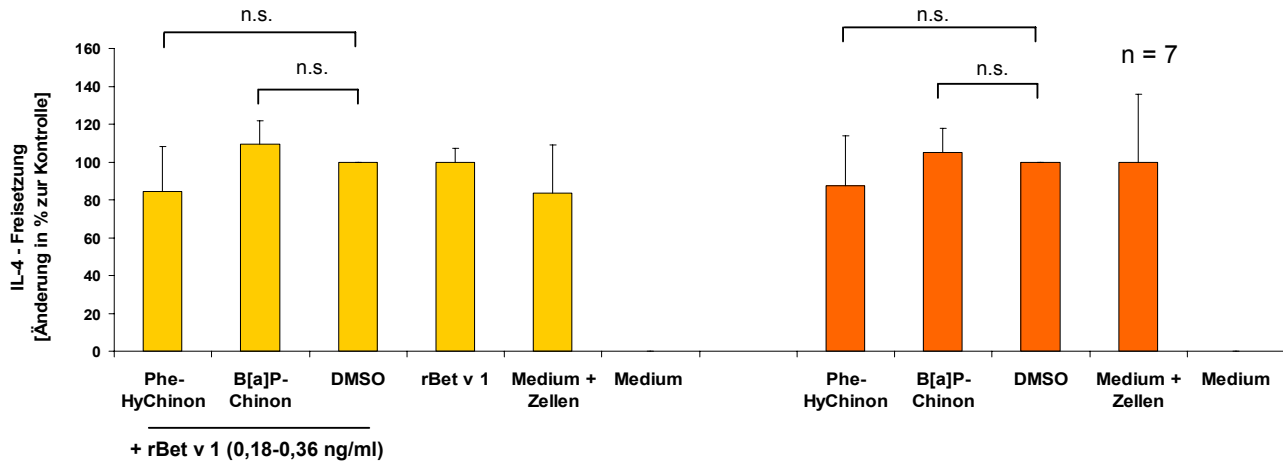


Abb.40: IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ M 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 μ M 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-4-Freisetzung aus den Ansätzen von 7 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (< 0,05 %).

Freisetzung von IL-8

Im Gegensatz zu Phenanthren und Benzo[a]pyren hatten ihre Derivate keinen signifikant verstärkenden Einfluss auf die IL-8-Freisetzung (Abb.41).

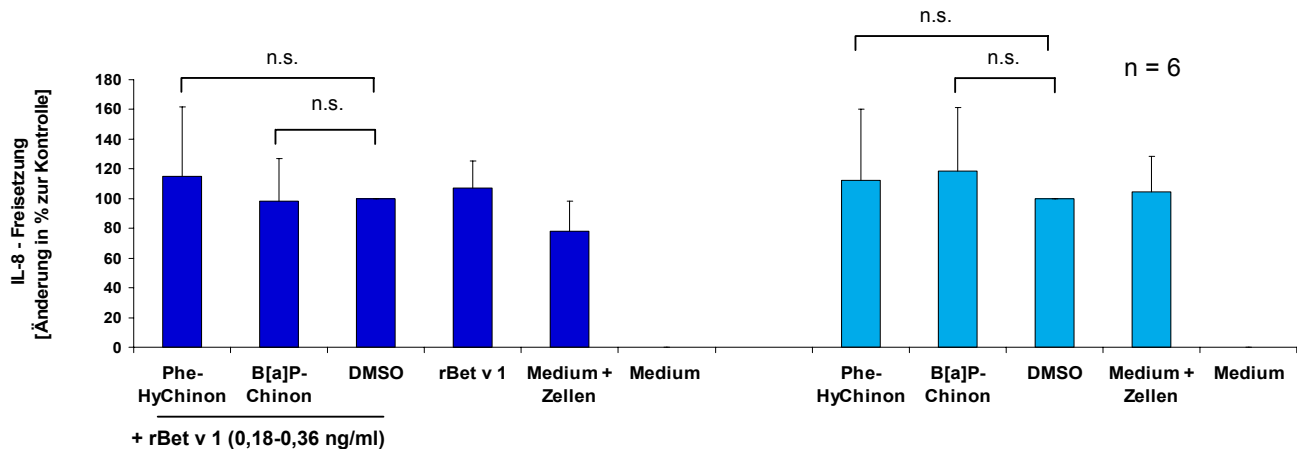


Abb.41: IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ M 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 μ M 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-8-Freisetzung aus den Ansätzen von 6 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (< 0,05 %).

Freisetzung von Histamin

Nur Phenanthren-9,10-Hydrochinon zeigte mit einer Erhöhung der Histamin-Freisetzung auf 115 % in Abwesenheit von rBet v 1 einen signifikanten Effekt. Auch die Inkubation mit 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon hatte erhöhte Histamin-Werte zur Folge (134 %), dies war aber nicht signifikant. Keine Effekte wurden in Koinkubation mit rBet v 1 beobachtet (Abb.42).

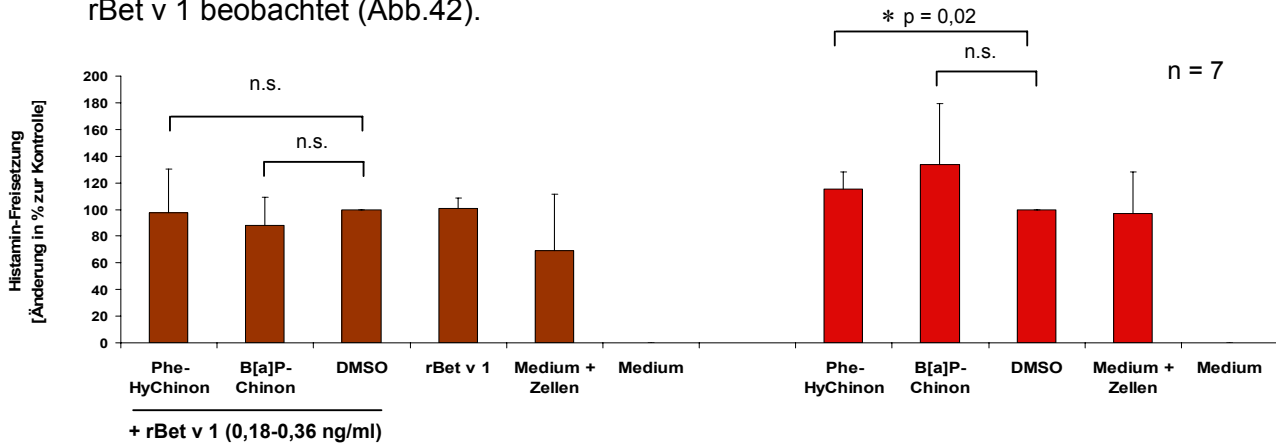


Abb.42: Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ M 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 μ M 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der Histamin-Freisetzung aus den Ansätzen von 7 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (< 0,05 %).

Freisetzung von Tryptase

Die Effekte von Phenanthren-9,10-Hydrochinon und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon auf die Tryptase-Freisetzung aus sensibilisierten Basophilen waren in allen Versuchen nicht signifikant unterschiedlich von der DMSO-Kontrolle (Abb.43).

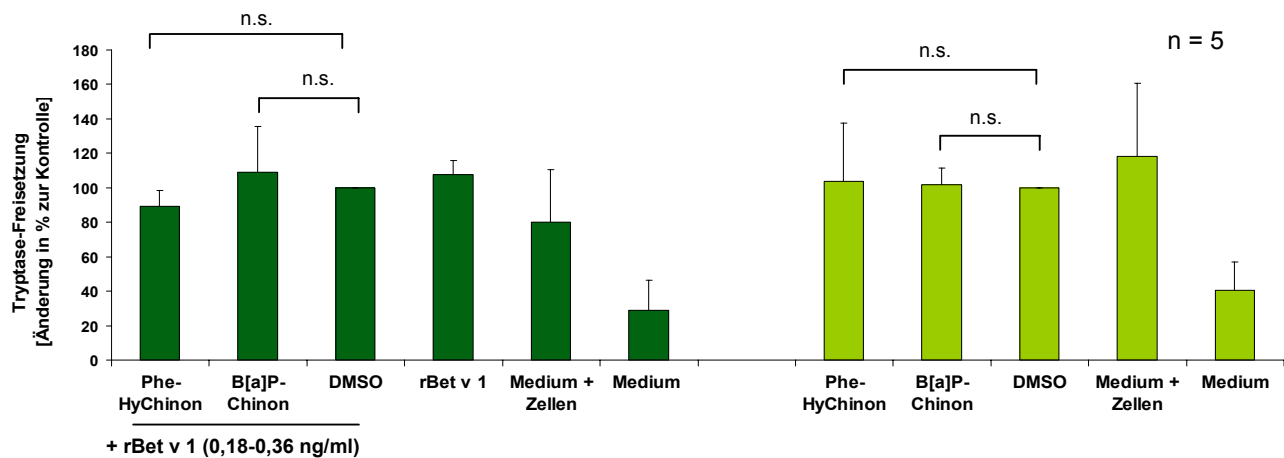


Abb.43: Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ M 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 μ M 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von rBet v 1 während der Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tryptase-Freisetzung aus den Ansätzen von 5 Probanden als Änderung in % zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (< 0,05 %).

4.3.2.3 Einfluss von Phenanthren, Benzo[a]pyren, 9,10-Diacetoxy-Phenanthren und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon auf Basophile von Nichtallergikern

Bei den 5 (Tryptase: 4) untersuchten gesunden Kontrollpersonen waren keine Effekte durch die polyzyklischen Aromaten oder ihre Derivate auf die untersuchte Mediatorfreisetzung zu beobachten (Abb.44). Im Schnitt wurden ohne PAKs 1,75 pg/ml (\pm 0,90 pg/ml) IL-4, 8,34 pg/ml (\pm 5,56 pg/ml) IL-8, 1768 nM (\pm 1204 nM) Histamin und 7,18 μ g/l (\pm 4,76 μ g/l) Tryptase gemessen.

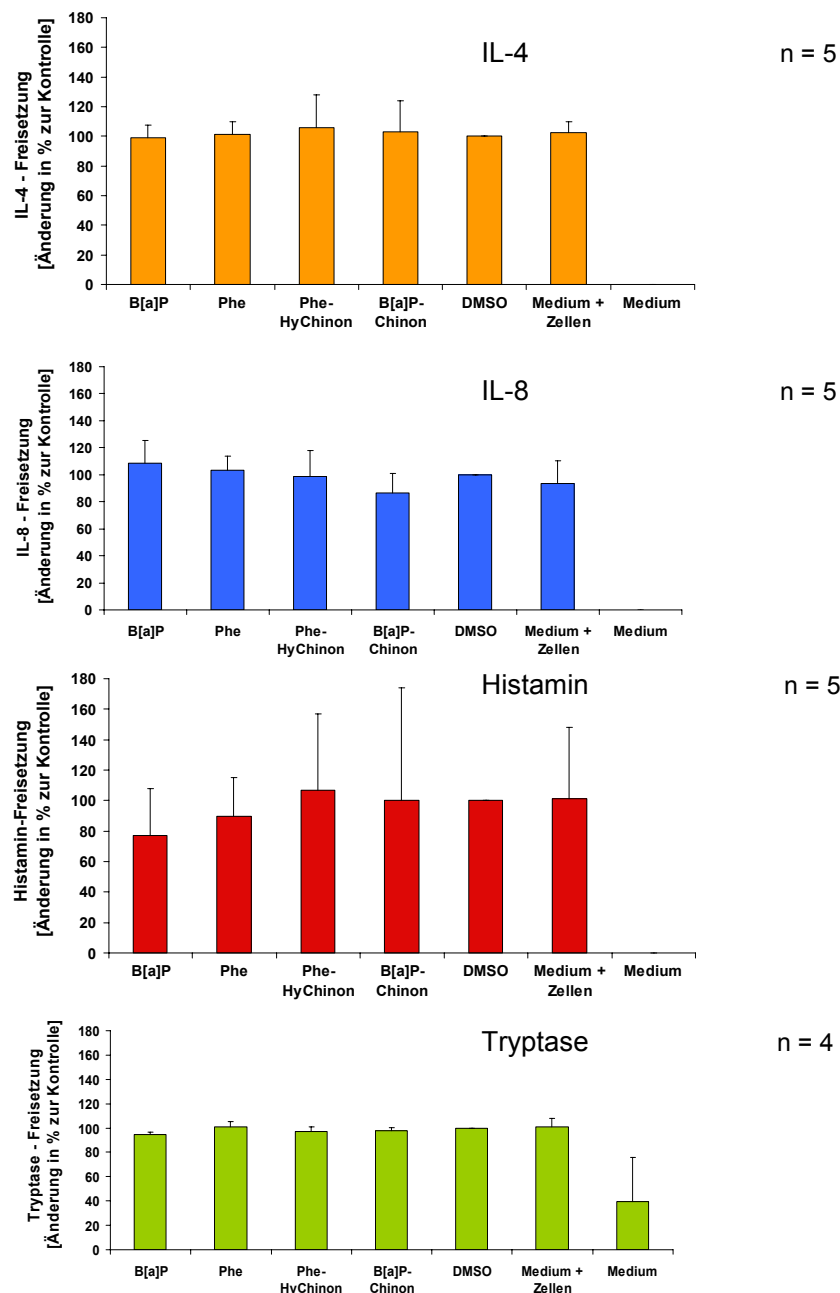


Abb.44: IL-4-, IL-8-, Histamin- und Tryptase-Freisetzung durch Basophile nichtallergischer Kontrollpersonen

4.3.2.4 Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse

Birkenpollenallergiker:

PAK	Interleukin-4		Interleukin-8	
	+ rBet v 1	- rBet v 1	+ rBet v 1	- rBet v 1
Benzo[a]pyren	(+) <i>p</i> = 0,20	+ <i>p</i> = 0,04	+++ <i>p</i> = 0,0004	++ <i>p</i> = 0,002
Phenanthren	(+) <i>p</i> = 0,48	+ <i>p</i> = 0,02	+ <i>p</i> = 0,03	+ <i>p</i> = 0,05
Phenanthren-Hydrochinon	(-) <i>p</i> = 0,10	(-) <i>p</i> = 0,20	(+) <i>p</i> = 0,74	(+) <i>p</i> = 0,84
Benzo[a]pyren-Chinon	(+) <i>p</i> = 0,09	k.E. <i>p</i> = 0,37	k.E. <i>p</i> = 0,68	(+) <i>p</i> = 0,38

PAK	Histamin		Tryptase	
	+ rBet v 1	- rBet v 1	+ rBet v 1	- rBet v 1
Benzo[a]pyren	k.E. <i>p</i> = 0,77	(+) <i>p</i> = 0,37	+ <i>p</i> = 0,02	(+) <i>p</i> = 0,49
Phenanthren	k.E. <i>p</i> = 0,80	+ <i>p</i> = 0,04	+ <i>p</i> = 0,04	(+) <i>p</i> = 0,78
Phenanthren-Hydrochinon	k.E. <i>p</i> = 0,59	+ <i>p</i> = 0,02	(-) <i>p</i> = 0,06	k.E. <i>p</i> = 0,97
Benzo[a]pyren-Chinon	k.E. <i>p</i> = 0,20	(+) <i>p</i> = 0,08	k.E. <i>p</i> = 0,55	k.E. <i>p</i> = 0,76

Tab.9: Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse

(-): nicht signifikant erniedrigt; (+): nicht signifikant erhöht; +: signifikant erhöht ($p < 0,05$); ++/+++ : hochsignifikant erhöht ($p < 0,01$ bzw. $< 0,001$); k.E.: kein Effekt; Werte jeweils gegen dazugehörige DMSO-Kontrolle

Nichtallergiker:

Die untersuchten PAKs hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Mediatorfreisetzung aus nicht-sensibilisierten Basophilen.

4.3.3 Migrationsassay

Um die chemotaktische Wirkung des von den Basophilen freigesetzten IL-8 zu testen, wurde ein Migrationsassay mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden neutrophile Granulozyten derjenigen Spender isoliert, von denen ursprünglich auch die Basophilen isoliert worden waren. Als Negativkontrolle wurde Medium, als Positivkontrolle 1×10^{-8} M Leukotrien B₄ eingesetzt. Die Anzahl der Neutrophilen, die nach 1 Stunde durch die Poren der Transwellschalen in die Überstände migriert waren, wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Der Migrationsindex ergibt sich als Quotient der gemessenen Zellzahl der Probe und des Mediumwertes. Bei den zwei untersuchten Probanden (Patient II und Patient X) wurde im Migrationsassay keine erhöhte Migration der Neutrophilen durch die Basophilenüberstände im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet (Abb.45a). Daraufhin wurde durch Titration von IL-8 die Schwelle bestimmt, ab der sich eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile zeigt. Hierzu wurden wiederum Neutrophile aus dem Blut von zwei Probanden isoliert und IL-8 in einer Konzentrationsreihe von 1 µg/ml bis 0,1 pg/ml eingesetzt. Wie aus Abb.45b ersichtlich ist, zeigt IL-8 bei beiden Probanden ab einer Konzentration von 0,1 ng/ml eine positive Wirkung auf die Migration. Da die mittlere IL-8-Konzentration in den Überständen der 10 getesteten Probanden bei 77,73 pg/ml lag, konnte eine chemotaktische Wirkung auf Neutrophile durch die gewonnenen Basophilenüberstände *in vitro* durch den vorliegenden Assay nicht nachgewiesen werden.

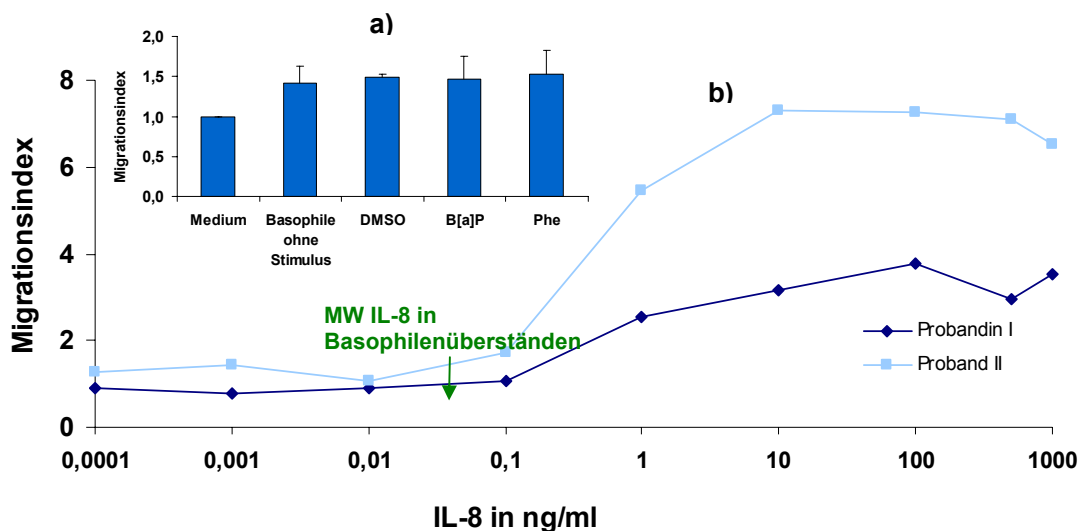


Abb.45: a): Migration der Neutrophilen durch Basophilenüberstände (Mittelwerte aus 2 Probanden)
b): Bestimmung der chemotaktischen Wirkungsschwelle von IL-8 auf Neutrophile zweier Probanden

4.4 Einfluss der Glutathion-S-Transferasen T1, M1 und P1

4.4.1 Genotypisierung der Birkenpollenallergiker

Aus der DNA der Birkenpollenallergiker wurden die Genotypen für die Glutathion-S-Transferase P1 (Probanden I-X) und die Glutathion-S-Transferasen M1 und T1 (Probanden I-IX) bestimmt. Für die *GSTP1* kam eine Real-Time-PCR-Methode (Applied Biosystems, Foster City, USA) zum Einsatz, der *GSTM1*-Genotyp wurde mittels PCR und anschließender Gel-Elektrophorese ermittelt. Während die Probanden I-IX mindestens ein funktionierendes Allel für die *GSTT1* besaßen (es also keinen *GSTT1*-Null-Genotyp gab), konnten sie bezüglich der *GSTM1* und *P1* eingeteilt werden (Tab.10).

Proband Nr.	GST T1		GST M1		GST P1		
	Wildtyp	Wildtyp	Null-Genotyp	Wildtyp (Genotyp I/I)	heterozygot (Genotyp I/V)	Mutante (Genotyp V/V)	
I	x		x	x			
II	x		x	x			
III	x		x			x	
IV	x	x			x		
V	x	x			x		
VI	x	x				x	
VII	x		x		x		
VIII	x		x			x	
IX	x		x	x			
X	n.t.	n.t.	n.t.		x		
XI	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	
XII	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	

Tab.10: Genotypisierung der Birkenpollenallergiker (*GSTM1* mittels PCR, *GSTP1* mittels Real-Time PCR); n.t. = nicht getestet

4.4.2 Korrelation von PAK-induzierten Effekten auf die Mediatorfreisetzung von Basophilen und dem GST-Genotyp

Für stärkere adjuvante Reaktionen von Dieselrußpartikeln wird nach Gilliland *et al.* (81) der *GSTM1*-Null-Genotyp bzw. der *GSTP1*-Wildtyp (I/I) verantwortlich gemacht, während das Vorhandensein des *GSTM1*-Wildtyps und der *GSTP1*-Mutante (V/V) als schützend angesehen wird. Unten aufgeführt ist eine Darstellung der Probanden I-X, die besonders stark (hier bezeichnet als „High Responder“ HR) oder besonders schwach (hier „Low Responder“ LR genannt) auf den EPA-PAK-Standard bzw. auf

die Einzel-PAKs Phenanthren und Benzo[a]pyren reagiert haben und die dazugehörigen Genotypen (Tab.11). Die jeweiligen genauen, prozentualen Werte finden sich im Anhang.

CD63-Expression (EPA-PAK-Standard), Basophilenaktivierungstest

	I	II	III	IV	V	VI
CD63	HR	HR	HR	HR	LR	LR
GSTM1	0	0	0	WT	WT	WT
GSTP1	I/I	I/I	V/V	I/V	I/V	V/V

IL-4 (B[a]P und Phe), aufgereinigte Basophile

	I	II	III	V	VI	VII	VIII
IL-4	LR	HR	HR	LR	LR	HR	HR
GSTM1	0	0	0	WT	WT	0	0
GSTP1	I/I	I/I	V/V	I/V	V/V	I/V	V/V

IL-8 (B[a]P und Phe), aufgereinigte Basophile

	I	II	III	V	VI	VIII	IX	X
IL-8	HR	HR	HR	LR	LR	HR	HR	HR
GSTM1	0	0	0	WT	WT	0	0	n.t.
GSTP1	I/I	I/I	V/V	I/V	V/V	V/V	I/I	I/V

Histamin (B[a]P und Phe), aufgereinigte Basophile

	I	II	III	VI	VIII
Histamin	LR	HR	HR	HR	HR
GSTM1	0	0	0	WT	0
GSTP1	I/I	I/I	V/V	V/V	V/V

Tryptase, aufgereinigte Basophile

	I	II	VIII	IX	X
Histamin	LR	HR	LR	HR	LR
GSTM1	0	0	0	0	
GSTP1	I/I	I/I	V/V	I/I	I/V

Tab.11: Darstellung der High Responder und Low Responder im Hinblick auf die CD63-Expression und die Mediatorfreisetzung und die dazugehörigen *GSTM1* und *P1*-Genotypen.

GSTM1 = Glutathion-S-Transferase M1; 0 = 0-Genotyp mit Deletion homozygot, kein funktionierendes *GSTM1*-Enzym; WT = Wildtyp, mind. 1 Allel ohne Deletion, funktionierendes *GSTM1*-Protein wird produziert; **GSTP1** = Glutathion-S-Transferase P1; I/I = *GSTP1*-Wildtyp; I/V = *GSTP1* heterozygot; V/V = *GSTP1*-Mutante; **HR** = High responder; **LR** = Low Responder

5 Diskussion

In verschiedenen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der Schadstoffbelastung der Außenluft und allergischen Atemwegserkrankungen gezeigt werden (88, 127, 222), was einen Hinweis darauf gibt, dass der Faktor der Luftverunreinigung für die steigende Prävalenz der Asthma- und Allergierkrankungen mitverantwortlich ist. Dieselrußpartikel gehören zu den bedeutendsten Luftschadstoffen in städtischen Gebieten. Aufgrund ihrer kleinen Größe erreichen sie nicht nur die oberen Atemwege, sondern auch den unteren Atemtrakt und verursachen eine Vielzahl von adversen Effekten auf die Gesundheit, unter anderem eine Verschlimmerung von allergischer Rhinitis und Asthma (83, 127, 139, 186). Dieselmotoremissionen bestehen aus einem inerten Kohlenstoffkern, der von einer Vielzahl organischer Verbindungen bedeckt ist, unter ihnen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) und deren redoxaktive Derivate (94). Sowohl im Tierversuch als auch in *in vivo* Studien am Menschen wurde gezeigt, dass Dieselruß-assoziierte PAKs durch erhöhte Produktion von Antigen-spezifischem IgE und T_H2-Zytokinen in die allergische Entzündungsreaktion eingreifen können (90, 107, 187).

Schober *et al.* zeigten 2006, dass organische Extrakte von Umweltaerosolen, die an einer stark befahrenen Straße (ca. 44.000 Fahrzeuge am Tag, davon 3800 LKW; Quelle: Planungsreferat München) gesammelt wurden, eine dosisabhängige Erhöhung der rBet v 1-induzierten Basophilenaktivierung bewirkten. Aerosolextrakte alleine hatten keine Effekte auf die CD63-Expression zur Folge, die Zellen nichtallergischer Kontrollprobanden blieben ebenfalls unbeeinflusst. Untersucht wurden zwei Aerosole, genannt AERex^{1d} und AERex^{5d}. AERex^{1d}, im Gegensatz zum AERex^{5d} (Juni) im Monat Februar gesammelt, enthielt die höhere Konzentration an PAKs (193). Dies geht mit Untersuchungen einher, die zeigten, dass die PAK-Konzentrationen in der Außenluft im Winter um ein Vielfaches höher sind als im Sommer (191). Dies wird unter anderem damit begründet, dass Kraftfahrzeuge im Winter länger brauchen, um die optimale Arbeitstemperatur zu erreichen, was zu erhöhten PAK-Emissionen führt (192). Weitere Faktoren, die ein erhöhtes Auftreten von PAKs in den Wintermonaten bewirken, sind Hausfeuerungsanlagen und die für Münchner Winter typische Inversionswetterlage (140, 191). AERex^{1d}, das Extrakt mit

20-fach höheren Gehalt an polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, hatte bei Schober *et al.* die stärkere Wirkung im Basophilenaktivierungstest (193). Diese Befunde wiesen bereits auf eine mögliche Rolle der PAKs für die gezeigten Effekte von organischen Aerosolextrakten auf Basophile hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Dieselruß-assoziierte PAKs direkt oder zusammen mit rBet v 1 die Aktivierung basophiler Granulozyten und die Mediatorfreisetzung aus Basophilen beeinflussen. Hierfür wurde Blut birkenpollenallergischer Patienten und gesunder, nicht-atopischer Kontrollen im Basophilenaktivierungstest simultan mit 16 EPA-PAKs und rBet v 1 inkubiert, dem Majorallergen der Birke, welches für einen großen Teil der Allergien in Mittel- und Nordeuropa verantwortlich ist. Außerdem wurden aufgereinigte Basophile von Allergikern und Kontrollpersonen mit Phenanthren und Benzo[a]pyren mit und ohne rBet v 1 stimuliert, um zum einen den Einfluss von Einzel-PAKs auf die FcεRI-gekoppelte Mediator-Freisetzung zu untersuchen, und um zum anderen Unterschiede in der proallergischen Aktivität von kanzerogenen und nicht-kanzerogenen PAKs einzuschätzen.

Der EPA-PAK-Standard der U.S. Environmental Protection Agency (EPA) wurde im Jahre 1988 als ein geeigneter Standard für die Stoffklasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe eingeführt und ist bis heute die klassische Kombination an kanzerogenen und nicht-kanzerogenen PAKs für wissenschaftliche Studien und zur Quantifizierung von PAK-Belastungen (202, 218). Er ist ein Gemisch aus den in der in der Umwelt bedeutsamsten PAKs (99, 140) und spiegelt somit ungefähr die PAK-Zusammensetzung wider, der Menschen im täglichen Leben ausgesetzt sind. Auch in den GC-MS-Untersuchungen der gesammelten Umwelt-aerosole von Schober *et al.* im Jahr 2003 konnten 14 der 16 EPA-PAKs detektiert werden (193).

Die Expression von CD63 auf humanen basophilen Granulozyten geht mit ihrer Aktivierung einher (25) und hat sich bereits in früheren Experimenten als geeigneter Untersuchungsparameter erwiesen (193). In dieser Arbeit zeigten alle 12 Birkenpollenallergiker des Probandenkollektivs eine Dosis-abhängige CD63-Expression mit rBet v 1. Der EPA-PAK-Standard bewirkte in Konzentrationen von 0,007 bis 7,2 ng/ml eine signifikante Hochregulation der rBet v 1-induzierten Basophilenaktivierung bei allen sechs getesteten Birkenpollenallergikern. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe alleine ohne rBet v 1 hatten keine Effekte zur Folge.

Nicht-sensibilisierte Basophile zeigten keine Reaktion auf die EPA-PAKs. Aufgrund ihrer beschränkten Wasserlöslichkeit wurden die PAKs in DMSO gelöst in die Tests eingesetzt. Um eventuelle biologische Effekte durch DMSO auszuschließen, wurde jeder Versuch mit einem DMSO-Test ohne PAKs kontrolliert. Weder wurde in einem der Versuche ein Effekt durch DMSO beobachtet, noch wurde die Löslichkeit der PAKs mit diesem Verfahren in einem der Experimente überschritten.

Der PAK-Gehalt der Außenluft beträgt im städtischen Bereich 0,3 bis 9,3 ng/m³, abhängig von Wetterlage und Verkehrsaufkommen (140, 191). Basierend auf einem PAK- Gesamtgehalt von 1,14 ng/m³, der 2003 in einem 1-Tages-Extrakt von PM_{2,5} gemessen wurde (AERex^{1d}: 4233,33 m³ Luft/ml), kann der Dosis-Bereich von 0,007 bis 7,2 ng/ml EPA-PAKs, der in dieser Arbeit zu signifikanten Effekten führte, mit der proallergischen Aktivität von PAKs in 0,006-6,315 m³ urbanem Feinstaub korreliert werden. Vergleichbare Luft-Äquivalente des Umweltaerosols AERex (0,014 - 0,755 m³) zeigten bei Schober *et al.* maximalen Effekt auf die Antigen-induzierte Basophilenaktivierung mit der gleichen Methodik und am gleichen Endpunkt (193). Auch wenn nicht klar ist, welche Menge der inhalieren PAKs letztlich die humanen Basophilen erreicht, liegen die korrelierten Luftvolumina deutlich unter der Menge von 15 m³, die ein Mensch am Tag im Durchschnitt einatmet, weshalb die Ergebnisse als relevant für die menschliche Exposition betrachtet werden.

Devouassoux *et al.* identifizierten 2002 humane basophile Granulozyten als ein Target für organische Bestandteile von Dieselruß (48). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Befunde und lassen vermuten, dass auch für die Resultate von Devouassoux *et al.* PAKs eine Rolle gespielt haben. Fahy *et al.* zeigten, dass PAKs aus Dieselrußpartikeln signifikant die Produktion von Chemokinen durch PBMCs erhöhten und sie stellten die Hypothese auf, dass dadurch die allergische Entzündungsreaktion gefördert werden könnte (68). Heo *et al.* demonstrierten an Mäusen, dass nicht nur organische Extrakte von DEP, sondern auch Phenanthren und Anthracen eine Erhöhung der Produktion von antigenspezifischem IgE zur Folge haben (90). Arbeiten von Takenaka *et al.* hatten bereits Jahre vorher eine erhöhte Produktion von IgE aus B-Zellen gezeigt, die mit PAKs aus Dieselruß inkubiert wurden (210). Tsien *et al.* berichteten über einen Anstieg der IgE-Produktion in humanen EBV-transformierten B-Zellen durch PAKs aus Dieselrußpartikeln und durch Phenanthren (217). Die Befunde der vorliegenden

Arbeit zeigen, dass auch humane sensibilisierte Basophile ein direktes Ziel für PAKs darstellen.

Die Aufnahme von Dieselruß-gebundenem Benzo[a]pyren in den Blutkreislauf wurde von Gerde *et al.* in Studien an Hunden untersucht. Nach Ablagerung in den Alveolen wurde eine Fraktion des Benzo[a]pyren innerhalb weniger Minuten von den Rußpartikeln abgetrennt und in den Blutkreislauf absorbiert. Ein Teil verblieb für mehrere Monate an Partikel gebunden in der Lunge. Der Anteil an schnell aufgenommenem B[a]P erschien hauptsächlich unmetabolisiert im Blut, begleitet von Phase I und Phase II - Metaboliten (79). Diese Resultate zusammen mit humanen Daten aus der Arbeitsmedizin (83) verdeutlichen die Bioverfügbarkeit partikelgebundener PAKs und die Relevanz der Absorption durch das alveoläre Epithel als Eintrittspforte in den menschlichen Organismus. Sind die polyzyklischen Aromaten im Blutkreislauf vorhanden, können sie mit Zellen, die in der Immunantwort eine Rolle spielen, interagieren, unter anderem mit basophilen Granulozyten.

Auffällig in den Ergebnissen des halbquantitativen Screenings, mit dem simultan die Antigen-abhängige Freisetzung mehrerer Zytokine aus sensibilisierten basophilen Granulozyten durch Benzo[a]pyren und Phenanthren untersucht wurden, war die Hochregulation von Thrombopoietin (TPO) und die des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) bei fast allen getesteten Probanden. TPO ist ein Hormon, der Hauptregulator der Megakaryocytopoese (Abschnürung der Blutplättchen), und wird hauptsächlich von Hepatozyten und Nierenzellen gebildet, stammt also nicht aus den basophilen Granulozyten der aufgereinigten Zellfraktion (111). VEGF wird v. a. von Tumorzellen, Makrophagen, Lungen- und Nierenepithelzellen gebildet und induziert unter anderem die Angiogenese, also die Gefäßneubildung (96). Es gibt Daten, die vermuten lassen, dass Basophile auch mittels VEGF eine Rolle in entzündlichen Vorgängen spielen (46). Eine nähere Untersuchung dieser Befunde konnte im Rahmen dieser Arbeit aber nicht erfolgen. Die Hochregulation von RANTES, einem Chemokin mit chemotaktischer Aktivität auf T-Zellen, Eosinophile und Monozyten und der Fähigkeit, die IgE-Produktion aus B-Zellen zu erhöhen, korreliert mit Arbeiten von Fahy *et al.*, ebenso wie die Runterregulation von MCP-1, einem starken chemotaktischen Faktor für Monozyten (2, 68, 115). Die Gruppe um Fahy konnte zeigen, dass PAKs aus Dieselrußpartikeln die aus PBMCs freigesetzte Menge an RANTES und IL-8 erhöhen und MCP-1 erniedrigen. Bezüglich dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass PAKs in einer *in vivo*-Situation

vornehmlich das Anlocken von Neutrophilen, Eosinophilen und T-Zellen verstärken und nicht das von Monozyten (68). Auch eine PAK-induzierte Erhöhung der Freisetzung von IL-4 und IL-8 wurde bei mehreren Probanden beobachtet. Diese Befunde wurden zusammen mit dem Einfluss von Benzo[a]pyren und Phenanthren auf die Histamin- und Tryptase-Freisetzung in einem größeren Kollektiv in quantitativen Bestimmungen näher untersucht.

Basophile Granulozyten sind eine Hauptquelle von *early*-IL-4, also Interleukin-4, welches im frühen Stadium der allergischen Reaktion ausgeschüttet wird, und spielen damit vermutlich eine wichtige Rolle in der Initiierung der Allergie (47). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die IL-4 - Freisetzung aus sensibilisierten Basophilen in Abwesenheit von rBet v 1 signifikant erhöhen, was für eine adjuvante Rolle von Dieselruß-assoziierten PAKs in der allergischen Sensibilisierung spricht. Auch Devouassoux *et al.* zeigten bereits eine Antigen-unabhängige Erhöhung der IL-4-Freisetzung aus basophilen Granulozyten durch Dieselrußpartikel. Die Effekte bei Devouassoux *et al.* traten aber, abweichend von den vorliegenden Ergebnissen, auch bei Basophilen von Nichtallergikern auf (48). Diskrepanzen zur vorliegenden Arbeit könnten eventuell durch die Komplexität der Dieselrußbestandteile erklärt werden und mit der damit verbundenen viel geringeren PAK-Konzentration in den Studien von Devouassoux *et al.*

Weiterhin erhöhten Benzo[a]pyren und Phenanthren in der vorliegenden Arbeit die IL-8-Freisetzung aus sensibilisierten Basophilen, wobei dieser Effekt mit und ohne Antigen auftrat. Diese Ergebnisse korrelieren mit Ergebnissen, die zeigen, dass PAKs, die aus Dieselrußpartikeln extrahiert wurden, die IL-8-Freisetzung aus PBMCs asthmatischer Patienten, die gegen Hausstaubmilbenallergen sensibilisiert waren, erhöhen (67). IL-8 ist Aktivator und Chemoattraktans für neutrophile Granulozyten und ist an akuten und chronischen Entzündungsprozessen beteiligt (98). Für Dieselrußpartikel konnte in bronchoalveolaren Spülungen gezeigt werden, dass sie das Einwandern von Leukozyten in die Atemwege fördern und die Mucosa-Entzündung verschlimmern, was auf eine erhöhte IL-8-Produktion durch Zellen des Atemwegstrakes zurückgeführt wird (185). Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Migrationsassays der PAK-stimulierten Basophilenüberstände konnte eine Chemotaxis des nachgewiesenen IL-8 *in vitro* zwar nicht gezeigt werden, dies kann aber auf die zu geringe Zellzahl (mit weniger als 1 % stellen Basophile den geringsten Anteil der zirkulierenden Leukozyten) und daher zu geringe Konzentration

des CXC-Chemokins in den Patientenproben zurückgeführt werden. Eine Migration neutrophiler Granulozyten wurde erst ab einer IL-8-Konzentration ermittelt, die über den der Basophilenüberstände in dieser Arbeit lag. *In vivo* könnte die durch Benzo[a]pyren und Phenanthren signifikant erhöhte IL-8-Konzentration durchaus von Bedeutung für allergische Patienten sein und Entzündungsprozesse verstärken.

Weiterhin wurde eine signifikante Erhöhung der Freisetzung von Histamin aus sensibilisierten Basophilen nach Stimulation mit Phenanthren erhalten. Die ebenfalls verstärkte Histamin-Freisetzung durch Benzo[a]pyren war hier nicht signifikant. Durch Koinkubation mit rBet v 1 ohne PAKs wurde der Histamin-Release im Vergleich zur Kontrolle im Mittel um 81 % erhöht, wobei beide PAKs keine zusätzlichen Effekte mehr zur Folge hatten. Ein ähnlicher Effekt auf die Antigen-unabhängige Histamin-Freisetzung aus Basophilen durch Dieselrußpartikel wurde von Devouassoux *et al.* beschrieben.

Der Tryptase-Wert wurde in der vorliegenden Arbeit durch beide PAKs erhöht. Obwohl die Effekte in Abwesenheit von rBet v 1 stärker ausgeprägt waren, sind statistisch nur die Ergebnisse bei Koinkubation mit rBet v 1 signifikant. Hierfür ist vermutlich die hohe Standardabweichung bei den Versuchen ohne rBet v 1 verantwortlich. Die eingesetzte rBet v 1-Konzentration alleine bewirkte eine erhöhte Tryptase-Freisetzung von 43 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ohne Antigen (Histamin: 81 %), was erklärt, dass die Effekte der PAKs auf die Tryptase-Freisetzung im Gegensatz zum Histamin auch in den Ansätzen mit Antigen zum Tragen kommen. Dass die die Freisetzung der beiden gespeicherten Mediatoren Histamin und Tryptase, die nach Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran abgegeben werden, häufig nicht parallel zueinander verlaufen (39), zeigen z.B. auch Daten für die Spätphasen-Reaktion, bei der zwar eine Histamin, nicht aber eine Tryptase-Freisetzung gemessen werden konnte (138).

Die Erhöhung der Freisetzung von IL-4, IL-8, Histamin und Tryptase durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe bei humanen Primärzellen *in vitro* könnte *in vivo* zu einer Verschlimmerung der Symptomatik der allergischen Rhinitis führen. Das vermehrt freigesetzte Histamin könnte zu einer vermehrten Erweiterung der Gefäße führen, IL-8 zu einer gesteigerten Rekrutierung inflammatorischer Zellen. Die erhöhten IL-4-Level könnten den Antikörper-Switch fördern und damit die Produktion von IgE aus B-Zellen erhöhen, die Bildung von T_H2-Zellen aus T_H0-Zellen fördern und die Expression von Adhäsionsmolekülen steigern. Diese

Adhäsionsmoleküle (v.a. VCAM-1) hätten eine vermehrte transendotheliale Migration von z.B. eosinophilen Granulozyten zur Folge (69). Von Diaz-Sanchez *et al.* ist gezeigt worden, dass Dieselrußpartikel in der Lage sind, in der menschlichen Mukosa durch nasale Provokation eine Sensibilisierung gegen ein Neoallergen zu induzieren (51). Die Tatsache, dass Basophile IgE-unabhängig mit polyzyklischen Aromaten reagieren, könnte bedeuten, dass auch PAKs als Bestandteile der organischen Phase von Dieselrußpartikeln nicht nur zur Unterhaltung und Verschlimmerung bestehender allergischer Erkrankungen, sondern durch die verstärkte Freisetzung von IL-4 und der damit induzierten T_H2-Antwort auch zur Neuentwicklung einer Sensibilisierung gegen Allergene beitragen könnten.

Insgesamt zeigen die Resultate der vorliegenden Arbeit, dass sensibilisierte Basophile ein direktes Ziel für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sind. Der EPA-PAK-Standard bewirkte im Basotest[®] zusammen mit rBet v 1 eine signifikante Erhöhung der Basophilenaktivierung, Benzo[*a*]pyren und Phenanthren erhöhten signifikant antigen-unabhängig die Mediator-Freisetzung aus aufgereinigten sensibilisierten Basophilen. Diese Ergebnisse lassen außerdem auf unterschiedliche Mechanismen der Zellaktivierung durch Einzel-PAKs und PAK-Gemische schließen.

PAKs sind hydrophob und binden in der Zelle entweder an den cytoplasmatischen Ah-Rezeptor oder an lipophile Kompartimente (157). Bei Bindung an den Rezeptor kommt es zum abdissoziieren der Hilfsproteine und zur Translokation des Komplexes in den Zellkern. Das nukleäre Protein ARNT (Ah receptor nuclear translocator) dimerisiert mit dem Ligand-Ah-Rezeptor-Komplex zu einem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor. Dieser bindet an regulatorische DNA-Sequenzen, wodurch eine Regulation der Gentranskription erfolgt. Unter anderem wird die Bildung von Cytochromen (CYP) der 1A Familie induziert (238). PAKs und ihre redoxaktiven Metaboliten (Ketone, Chinone) bewirken durch die Induktion von *CYP1A*-Genen oder durch intrazelluläres Redox-Cycling die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (26, 141, 167). Außerdem können Cytochrome P450 und Peroxidasen durch Ein-Elektronen-Oxidation aus PAKs reaktive Radikal-Kationen bilden (40, 198).

Die Glutathion-S-Transferasen M1, P1 und T1 gehören zu den wichtigsten Enzymen, die für die Detoxifizierung von ROS und elektrophilen PAK-Metaboliten verantwortlich sind. *GSTM1*-Null-Genotyp bedeutet, dass die jeweiligen Probanden die Deletion homozygot tragen. Sie exprimieren also kein funktionales *GSTM1*-Enzym. *GSTM1*-Wildtyp bedeutet, dass die Probanden mindestens ein nicht-deletiertes Allel haben

und somit ein funktionales Enzym gebildet wird. Die Häufigkeit der Null-Genotypen beträgt in der kaukasischen Bevölkerung ca. 50 % (214). Bei der *GSTP1* existiert ein häufiger Einzel-Nukleotid-Polymorphismus im Kodon A105G. Das Resultat ist ein Aminosäureaustausch im exprimierten Protein von Isoleucin zu Valin und eine Veränderung der Enzymfunktion, die zu verstärkter katalytischer Aktivität der *GSTP1* führt (103). Genotyp I/I bezeichnet den *GSTP1*-Wildtyp, Genotyp I/V steht für heterozygote Individuen und Genotyp V/V ist die Mutante, bei der durch beide Allele Valin ins Enzym eingebaut wird (81). Der Anteil des Wildtyps in der Bevölkerung beträgt ca. 43 %, der der Mutante ca. 11 %, und ca. 46 % sind heterozygot (231). Studien von Gilliland *et al.* haben gezeigt, dass Unterschiede in der Glutathion-S-Transferase die Immunantwort auf Dieselrußpartikel beeinflussen kann. Amprosia-pollenallergiker mit *GSTM1*-Null-Genotyp und *GSTP1*-Wildtyp, denen Dieselrußpartikel mit Allergen in die Nase appliziert worden waren, litten unter einer erhöhten allergischen Reaktion, während sich bei Provokation mit dem Allergen alleine keine Unterschiede bei den IgE- und Histamin - Konzentrationen in der Nase zeigten (81). Patienten beider Genotypen zeigten nach der Kostimulation mit Allergen und Dieselrußpartikeln erhöhte Level an IgE und Histamin in der Nase, wobei der Effekt am stärksten war, wenn Genotypen *GSTM1*-Null-Genotyp und *GSTP1*-Wildtyp (I/I) zusammentrafen. Die Genotypisierung der Birkenpollenallergiker I-X unserer Probanden zeigte bei drei Patienten diese Kombination des *GSTP1*-Wildtyps und des *GSTM1*-Null-Genotyps, bei Patientin I, Patient II und Patient IX. Patient II ist starker Atopiker, hatte den höchsten Level an Gesamt-IgE und zeigte in allen Untersuchungen dieser Arbeit die stärksten Effekte auf PAKs (alle Werte finden sich im Anhang S. XXXVI ff.). Patientin I reagierte auf die EPA-PAKs mit einer stark erhöhten CD63-Expression, und auch die Freisetzung von IL-8 war nach Stimulation mit Benzo[a]pyren und Phenanthren deutlich erhöht, ebenso wie bei Patient IX. Patient IX zeigte zusätzlich auch bei der Tryptase-Freisetzung im Vergleich zu den anderen Probanden hohe Werte. Die Patientinnen III und VIII, auch Patientinnen mit besonders starker Reaktion, besitzen ebenfalls den *GSTM1*-Null-Genotyp, aber in Kombination mit der *GSTP1*-Mutante (V/V-Genotyp). Dies ist nicht widersprüchlich zur Literatur, die besagt, dass bereits einer der beiden Genotypen ausreicht, die Reaktion zu verstärken (81). Auch bei Patient VII findet sich der *GSTM1*-Null-Genotyp in Verbindung mit einem deutlichen Anstieg der IL-4-Freisetzung bei Inkubation mit Phenanthren in Abwesenheit von rBet v 1. Patientin VI, die Patientin,

die nach Gilliland *et al.* als einzige Patientin durch ihre Kombination des *GSTM1*-Wildtyps und der *GSTP1*-Mutante vor adjuvanten Wirkungen der Inhaltsstoffe von Dieselrußpartikeln am besten geschützt sein sollte, zeigte passend dazu nur schwache Effekte auf die PAKs. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen somit weitgehend die von Gilliland *et al.* gefundene Bedeutung des *GST*-Genotyps besonders im Hinblick auf die *GSTM1* und zeigen, dass *GSTM1* und *GSTP1* nicht nur bei den Effekten von Dieselrußpartikeln, sondern auch bei der Wirkung ihrer PAK-Bestandteile eine wichtige Rolle spielen könnten.

Das vorhandene Kollektiv enthält unter den 12 Birkenpollenallergikern 4 Raucher (Patienten I, IV, V, XII), die in den Versuchen zwar vorhandene, aber tendenziell eher schwächere Reaktionen zeigten. Die Bedingung zur Studienteilnahme war, 12 Stunden vor der Blutentnahme nicht zu rauchen, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine höhere Grundbelastung an PAKs in Körper der Raucher die Effekte in dieser Gruppe beeinflusst.

Die am meisten verbreitete Erklärung für die verstärkende Wirkung der PAKs auf die allergische Reaktion ist ein Mechanismus über die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und damit durch die Erzeugung von oxidativem Stress. Die erhaltenen Ergebnisse für die ROS-detoxifizierenden *GSTM1* und *GSTP1* weisen auch in dieser Arbeit auf eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an den ermittelten Effekten der PAKs hin. Kepley *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen, dass nicht nur Benzo[*a*]pyren, sondern auch seine Metabolite 1,6- und 3,6-Benzo[*a*]pyren-Chinon die IgE-vermittelte Histamin- und IL-4-Freisetzung erhöhen (114). Die genannten Chinone entstehen aus Benzo[*a*]pyren als Produkt der Einwirkung von UV-Licht, Cytochromen P450 oder Peroxidasen und sind als Verursacher von oxidativem Stress bekannt (114, 142). Die Effekte von 1,6-Benzo[*a*]pyren-Chinon bei Kepley *et al.* konnten durch das Antioxidans N-Acetylcystein verhindert werden (114). In einer anderen Untersuchung wurden die adjuvanten Effekte von DEP auf die Ovalbumin-induzierte allergische Immunantwort in Mäusen durch Thiol-Antioxidantien unterdrückt (237). Reaktive Sauerstoffspezies sind an zahlreichen intrazellulären Prozessen beteiligt. Sie erfüllen Funktionen in der Abwehr gegen Krankheitserreger, greifen durch Inaktivierung phosphorylierter Kinasen in die Signaltransduktion ein und sind in der Lage, sowohl Proliferation als auch Apoptose zu induzieren. H₂O₂ beispielsweise ist in der Lage, Protein-Tyrosin-Kinasen zu aktivieren und damit in das MAP-Kinase-Signal-System einzugreifen

(108). Kepley *et al.* stellten für den Mechanismus ihrer Antigen-abhängigen Beobachtungen die Hypothese auf, dass durch die Erhöhung der Protein-Tyrosin-Phosphorylierung nachgeordnete Effektor-Mechanismen das Antigen-Rezeptor-Signal verstärken (114). Durch die Möglichkeiten der ROS wäre auch ein Eingreifen in die intrazellulären Signaltransduktionswege denkbar, welches ohne eine Antigen-IgE-Rezeptor-Bindung zu einer Zellaktivierung und Degranulation führt, und so auch eine Antigen-unabhängige Reaktion erklären könnte. Auch Devouassoux *et al.* sprechen von einem Eingreifen von DEP in einen Mechanismus, der von dem des IgE-abhängigen unterschiedlich sein muss (48). Es wurden auch schon Allergene mit Protease-Aktivität gefunden, die IgE-unabhängig die Expression eines T_H2-Zytokin-Profiles in Basophilen bewirken (163). Kepley *et al.* zeigten eine signifikante Erhöhung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Verbindung mit einer antigeninduzierten Erhöhung der IL-4- und Histamin-Freisetzung durch 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon (114). In dieser Arbeit wurden der Einfluss von Phenanthren-9,10-Hydrochinon (aus 9,10-Diacetoxyphenanthren) und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon, zweier Metaboliten von Phenanthren und Benzo[a]pyren, untersucht. 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon entsteht durch den Fremdstoffmetabolismus (Cytochrome P450 Isoenzyme und Peroxidasen) oder durch UV-Licht aus Benzo[a]pyren (43, 169). B[a]P-Chinone sind hochreaktive chemische Verbindungen und verursachen oxidativen Stress durch die Bildung von Superoxidanion, H₂O₂ und dem Hydroxylradikal (72, 142). Phenanthren-9,10-Hydrochinon spielt unter anderem eine Rolle in der oxidativen Modifizierung von Proteinen. Phenanthren-9,10-Hydrochinon und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon und erhöhten in der vorliegenden Studie die Histamin-Freisetzung aus sensibilisierten Basophilen, wobei sich nur die Ergebnisse für Phenanthren-9,10-Hydrochinon als signifikant erwiesen. Davon abgesehen, zeigten die beiden Derivate keine signifikanten Effekte auf die IL-4 und die IL-8-Freisetzung. Dies steht im Widerspruch zu den Arbeiten von Kepley *et al.*, die nach Inkubation von Basophilen mit 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon eine im Vergleich zum Benzo[a]pyren sogar noch erhöhte Freisetzung von Histamin und IL-4 beobachten konnten (114). Während in der vorliegenden Arbeit primäre humane Basophile unverändert verwendet wurden, kamen bei Kepley *et al.* Basophile zum Einsatz, deren IgE an der Oberfläche entfernt wurde. Die Zellen wurden dann mit anti-NIP-IgE inkubiert und später mit NIP-BSA als Antigen inkubiert. Die unterschiedliche Methodik könnte eventuell ein Grund für die Differenzen in den Ergebnissen sein. Die

höhere Polarität der eingesetzten Substanzen im Vergleich zum Mutterkohlenwasserstoff und die damit verbundene eventuelle verringerte Bioverfügbarkeit könnte eine Erklärung dafür sein, warum Phenanthren-9,10-Hydrochinon in der vorliegenden Arbeit nicht die gleichen Eigenschaften zeigte wie Phenanthren. Oder es sind andere reaktive PAK-Metaboliten, die in basophilen Granulozyten zur Bildung von ROS und den damit verbundenen Effekten führen. Eine Beteiligung von ROS an den gezeigten Effekten der PAKs auf Basophile bleibt nicht zuletzt aufgrund der gezeigten Unterschiede von Patienten mit verschiedenen GST-Genotypen wahrscheinlich.

Neueste Studien von Wan *et al.* berichten über weitere Phase II-Enzyme, über Chinon-Oxidoreduktasen, deren Induktion die Erhöhung der IgE-Produktion durch B-Zellen, die durch Extrakte aus Dieselrußpartikeln bewirkt wurde, blockieren konnte (230). Auch Unterschiede im Phase-I-Metabolismus, der Funktionalisierung von Fremdstoffen, wären denkbar, um beispielsweise die Unterschiede der gefundenen Resultate zwischen Allergikern und Nichtallergikern zu erklären. Hierzu wären weitere Untersuchungen auf RNA-Ebene von Nutzen. Bei der Frage nach dem Wirkmechanismus von Luftschadstoffen wird auch über eine Beteiligung von Toll-like-Rezeptoren diskutiert (186). Bereits an Mäusen gezeigt werden konnte ein Einfluss von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) auf die Ozon-induzierte Hyperpermeabilität der Lunge (80). Bei Mastzellen ist bekannt, dass durch TLR4-vermittelte Aktivierung die Freisetzung von IL-8 und proinflammatorischen Zytokinen induziert wird (156). Die Untersuchungen hierzu stehen aber erst am Anfang.

Aufgrund gewonnener Erkenntnisse über adverse Gesundheitseffekte von Feinstaub wurde in den letzten Jahren auf politischer Ebene bereits an einer Reduktion von Luftschadstoffen gearbeitet. In der EU-Richtlinie vom 22.4.1999, die in der 22. Bundesimmissionsschutzverordnung (BImSchV) aus dem Jahr 2002 in deutsches Recht umgesetzt worden ist, sind Grenzwerte für PM₁₀ definiert, die seit dem 1.1.2005 eingehalten werden müssen. Der einzuhaltende Tagesmittelwert für PM₁₀ beträgt demnach 50 µg/m³ bei 35 zugelassenen Überschreitungen im Kalenderjahr (Quelle: Umweltbundesamt, 22. BImSchV). Im September 2006 stellte die EU-Kommission den Entwurf einer neuen Richtlinie vor, in der auch eine Konzentrationsobergrenze für PM_{2,5} eingeführt werden soll. Diese wird voraussichtlich 2008 in Kraft treten und dann in deutsches Recht umgesetzt werden (Quelle: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucher-

schutz). Nicht zuletzt unter Berücksichtigung der Erkenntnisse über ein Allergieförderndes Potential bestimmter Bestandteile der organischen Phase, wie sie auch in dieser Arbeit dargestellt wurden, sollte eine Reduktion der Feinstaubbelastung unbedingt weiter verfolgt werden. Mit der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe konnte eine Stoffgruppe identifiziert werden, die nicht nur teilweise kanzerogenes Potential besitzt, sondern offenbar auch Allergiefördernde Wirkung aufweist. Eine Reduktion des Anteils dieser Substanzen in den Rußpartikeln der Außenluft könnte eine weitere Möglichkeit sein, den adversen Gesundheitseffekten entgegenzuwirken. Der Einsatz von Biodiesel, gewonnen aus nachwachsenden Rohstoffen, scheint keinen positiven Effekt auf die Freisetzung von polyzyklischen Aromaten zu haben (248). In Schweden allerdings wurde ein umweltfreundlicher Dieseltreibstoff mit dem Namen MK1 eingeführt, der 11 % weniger Partikel, 2 % weniger CO, 11 % weniger NO_x und 88 % weniger PAKs emittiert als ein europäischer Vergleichsstandard. Somit wurde hier nicht nur die Partikelzahl reduziert, sondern auch der Anteil der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe auf der Oberfläche der Dieselrußpartikel drastisch verringert. Der Marktanteil von MK1 in Schweden lag im Jahr 2000 bei 93 % (102, 236). Neben Fahrverboten, einer denkbaren Veränderung von Verbrennungsprozessen oder der Entwicklung besser wirksamer Partikelfilter könnten auch derartige Bemühungen einer Umstellung des verwendeten Brennstoffs ein Beispiel dafür sein, wie wissenschaftliche Erkenntnisse zum Nutzen von Umwelt und Gesundheit praktisch umgesetzt werden können.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) als Bestandteil der organischen Phase von Dieselrußpartikeln auf basophile Granulozyten von Birkenpollenallergikern untersucht.

Die Wirkung des EPA-PAK-Standards (stellvertretend für die Stoffklasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe) auf humane Basophile wurde in heparinisiertem Vollblut am Parameter der CD63-Expression als Marker für das Maß der Basophilenaktivierung bestimmt. Alle Allergiker des Patientenkollektivs zeigten eine Dosis-abhängige CD63-Expression nach Stimulation mit rBet v 1, dem Major-Allergen von Birkenpollen. Bei maximaler Dosis-Wirkungsbeziehung zeigten die 6 getesteten Birkenpollenallergiker eine signifikante Hochregulation ($21,07 \% \pm 24,10 \%$ auf $65,60 \% \pm 13,66 \%$) der rBet v 1-induzierten Basophilenaktivierung nach Inkubation mit dem EPA-PAK-Standard. Der PAK-Standard alleine, ohne Allergen, hatte ebenso wie DMSO und PBS keinen Einfluss auf die Basophilenaktivierung. Die CD63-Expression der Basophilen aller gesunden Kontrollprobanden lag unter 5 % und wurde weder durch rBet v 1 noch durch die EPA-PAKs beeinflusst.

Bei der Untersuchung der Mediatorfreisetzung aus aufgereinigten Basophilen nach Inkubation mit den Einzel-PAKs Phenanthren und Benzo[a]pyren wurde im halbquantitativen Protein-Array-Screening bei 2 bzw. 3 von 6 Patienten eine Erhöhung der Freisetzung von IL-13, IL-8 und IL-4 festgestellt. Mittels ELISA konnte an 10 bzw. 11 Birkenpollenallergikern eine Antigen-unabhängige, signifikante Erhöhung der Freisetzung von Histamin, IL-4 und IL-8 durch Phenanthren und eine signifikante Erhöhung der Freisetzung von IL-4 und IL-8 durch Benzo[a]pyren gezeigt werden. Auch der Tryptase-Wert wurde durch beide PAKs erhöht, wobei nur die Ergebnisse bei Koinkubation mit rBet v 1 statistisch signifikant waren.

Phenanthren-9,10-Hydrochinon erhöhte signifikant die Histamin-Freisetzung aus sensibilisierten Basophilen. Davon abgesehen zeigten die beiden redox-aktiven Derivate Phenanthren-9,10-Hydrochinon und 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon keine

signifikante Wirkung auf die Freisetzung von IL-4, IL-8 oder Tryptase aus sensibilisierten Basophilen in An- oder Abwesenheit von Antigen.

Eine PAK-induzierte Erhöhung der Mediatorfreisetzung wurde nur bei Basophilen von Allergikern beobachtet. Keiner der PAKs hatte dagegen einen Einfluss auf die Freisetzung von IL-4, IL-8, Histamin oder Tryptase aus basophilen Granulozyten nicht-allergischer Kontrollen.

Untersuchungen an Glutathion-S-Transferasen zum Einfluss des Fremdstoffmetabolismus auf die beobachteten PAK-Effekte bestätigten weitgehend die bereits vorliegende Erkenntnisse, dass Allergiker mit *GSTM1*-Null-Genotyp und *GSTP1* I105-Wildtyp stärker auf die Stimulation mit Dieselruß und Allergen reagieren als jene Patienten mit katalytisch aktiven GSTs (81). Auch in der vorliegenden Studie zeigten besonders die Patienten mit *GSTM1*-Null-Genotyp tendenziell stärkere Reaktionen auf die EPA-PAKs und rBet v 1 als die Allergiker, die ein funktionierendes Enzym exprimieren.

Insgesamt wurden sowohl Antigen-abhängige als auch Antigen-unabhängige Effekte von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf basophile Granulozyten gezeigt. *In vivo* könnten diese durch erhöhte FcεRI-gekoppelte Mediator-Freisetzung zur Aggravation allergischer Erkrankungen führen. Die gezeigten spezifischen Effekte von PAKs auf die Zellen von Birkenpollenallergikern könnten ein signifikant erhöhtes Gesundheitsrisiko für die Population der Allergiker bedeuten, wenn diese beispielsweise durch verkehrsbedingte Luftverschmutzung in Großstädten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen ausgesetzt sind. Durch die Antigen-unabhängige, verstärkte Freisetzung von IL-4 und der damit verbundenen Initiierung einer proinflammatorischen, T_H2-dominierten Immunantwort wäre es außerdem denkbar, dass PAKs *in vivo* zur Neuentwicklung einer Sensibilisierung beitragen.

IV Literaturverzeichnis

- 1 **Aberg N.** Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clin Exp Allergy* 1989; 19:59-63
- 2 **Alam R., Stafford S., P Forsythe P., Harrison R., Faubion D., Lett-Brown M.A., Grant J.A.** RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils, *J Immunol* 1993; 150:3442–3447
- 3 **Alessandrini F., Schulz H., Takenaka S., Lentner B., Karg E., Behrendt H., Jakob T.** Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:824-30
- 4 **Aw T.Y.** Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:557-65
- 5 **Bahadir M., Palar H., Spitteller M.** (Hrsg.). Springer Umweltlexikon. Springer Verlag, Berlin, 1995; 759-760
- 6 **Baltes W.** Lebensmittelchemie. Springer Verlag, Berlin, 1983
- 7 **Bascom R., Bromberg P.A., Costa D.A., Devlin R., Dockery D.W., Frampton M.W., Lambert W., Samet J.M., Speizer F.E., Utell M.** Health effects of outdoor air pollution. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:3-50
- 8 **Bascom R., Naclerio R.M., Fitzgerald T.K., Kagey-Sobotka A., Proud D.** Effect of ozone inhalation on the response to nasal challenge with antigen of allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:594-601
- 9 **Batard T., Didierlaurent A., Chabre H., Mothes N., Bussi eres L., Bohle B., Couret M.N., Ball T., Lemoine P., Focks Tejkl M., Chenal A., Clément G., Dupont F., Valent P., Krauth M.T., André C., Valenta R., Moingeon P.** Characterization of wild-type recombinant Bet v 1a as a candidate vaccine against birch pollen allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136:239-249
- 10 **Becker W.M., Darsow U., Behrendt H.** Effects of extracts of airborne particulate matter on grass pollen *Dactylis glomerata*: allergen release and morphology. *Allergologie* 1990; 13:434
- 11 **Behrendt H.** Allergotoxikologie: Ein Forschungskonzept zur Untersuchung des Einflusses von Umweltschadstoffen auf die Allergieentstehung. In: *Allergieforschung: Probleme, Strategien und klinische Relevanz*, Ring J. (Hrsg.), MMV Medizin-Verlag, München 1992; 123-130
- 12 **Behrendt H.** Umwelteinflüsse und Allergie. *Allergo J* 1995; 4:455
- 13 **Behrendt H., Becker W.M.** Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Curr Opin Immunol* 2001;

- 13:709-715
- 14 **Behrendt H., Becker W.M., Friedrichs K.H., Darsow U., Tomigas R.** Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99:425-8
- 15 **Behrendt H., Becker W.M., Fritzsche C., Sliwa-Tomczok W., Tomczok J., Friedrichs K.H., Ring J.** Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:69-74
- 16 **Behrendt H., Friedrichs K.H., Darsow U., Kainka-Stänicke E., Becker W.M., Tomingas R.** Allergens and pollutants in the air - a complex interaction. In: *New Trends in Allergy III*, Ring J., Przybilla B. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1991; 467-478
- 17 **Behrendt H., Krämer U., Dolgner R., Hinrichs J., Willer H., Hagenbeck H., Schlipkötter W.** Elevated levels of total IgE in East Germany children: Atopy, parasites or pollutants? *Allergo J* 1993; 2:31-40
- 18 **Behrendt H., Krämer U., Dolgner R., Hinrichs J., Willer H.J., Hagenbeck H., Schlipkötter H.W.** Elevated levels of total serum IgE in East German children: atopy, parasites or pollutants? A comparative study among 2054 preschool children in East and West Germany. *Allergo J* 1993; 2:31-40
- 19 **Behrendt H., Krämer U., Dolgner R., Hinrichs J., Willer J., Hagenbeck H., Schlipkötter H.W.** Elevated levels of total IgE in East German children: atopy, parasites or pollutants? *Allergo J* 1993; 2:31-40
- 20 **Behrendt H., Ring J.** A research strategy for the investigation of the influence of environmental pollutants on the development of allergic sensitization and disease. In: *New Trends in Allergy IV*, Ring J.; Behrendt H.; Vieluf D. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1997; 51-60
- 21 **Björkstén B.** Environmental risk factors for atopy. In: *New Trends in Allergy IV*. Ring J., Behrendt H., Vieluf D. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, 1997; 3-12
- 22 **Björkstén B., Naaber P., Sepp E., Mikelsaar M.** The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:342-346
- 23 **Blackley C.H.** Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay fever or hay asthma). Baillière, Tindall and Cox (Hrsg.), Ltd, London, 1873
- 24 **Bochner B.S., Luscinskas F.W., Gimbrone M.A., Newman W., Sterbinsky S.A., Derse-Anthony C.P., Klunk D., Schleimer R.P.** Adhesion of human basophils, eosinophils and neutrophils to interleukin-1-activated human vascular

- endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991; 173:1553-6
- 25 **Bochner B.S.** Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106:292-302
- 26 **Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J.** Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 2000; 13:135-160
- 27 **Bostock J.** Case of a periodical affection of the eyes and chest. *Med Chir Trans London* 1819; 10:161-165
- 28 **Braun-Fahrländer C.** Environmental exposure to endotoxin and other microbial products and the decreased risk of childhood atopy: evaluating developments since April. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3:325-329
- 29 **Braun-Fahrländer C., Gassner M., Grize L., Neu U., Sennhauser F.H., Varonier H.S., Vuille J.C., Wüthrich B.** Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:28-34
- 30 **Brown H.M., Irving K.R.** The size and weight of common allergenic pollens. An investigation of their number per microgram and size distribution. *Acta Allergol* 1973; 28:132-7
- 31 **Brunekreef B., Dockery D., Krzyzanowski M.** Epidemiologic studies on short-term effects of low levels of major ambient air pollution components. *Environ Health Perspect* 1995; 103:3-13
- 32 **Bruske-Hohfeld I., Mohner M., Ahrens W., Pohlabein H., Heinrich J., Kreuzer M., Jockel K.H., Wichmann H.E.** Lung cancer risk in male workers occupationally exposed to diesel motor emissions in Germany. *Am J Ind Med* 1999; 36:405-14
- 33 **Bryniok, D.** Kommentar zu limitierenden Faktoren des PAK-Abbaus. In: *Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz.* Ch. Knorr C.H., von Schell T. (Hrsg.) Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1997; 166-170
- 34 **Bufe A., Spangfort M.D., Kahlert H., Schlaak M., Becker W.M.** The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta* 1996; 199:413-415
- 35 **Bühring H.J., Seiffert M., Giesert C., Marxer A., Valent P., Kanz L., Sano K.** The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical with ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (E-NPP3; CD203c). *Blood* 2001; 97:3303-3305
- 36 **Bühring H.J., Streble A., Valent P.** The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 133:317-329

- 37 **Burney P.G., Luczynska C., Chinn S., Jarvis D.** The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J* 1994; 7:954-960
- 38 **Carroll W.D., Lenney W., Jones P.W., Strange R.C., Child F., Whyte M.K., Primhak R.A., Fryer A.A.** Effects of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 on lung function in asthmatic families. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1155-61
- 39 **Caughey G.H.** Tryptase genetics and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:1411-1414
- 40 **Cavalieri E.L., Rogan E.G.** Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* 1995; 25:677-688
- 41 **Chapman M.D., Pomés A., Breiteneder H., Ferreira F.** Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:414-420
- 42 **Coca A.F., Cooke R.A.** On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol* 1923; 163-182
- 43 **Conney A. H.** Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 1982; 42:4875-4917
- 44 **Coombs R.R.A., Gell P.G.H.** The classification of allergic reactions underlying disease. In: *Clinical aspects of immunology*, Gell P.G.H., Coombs R.R.A. (Hrsg.); Davis, Philadelphia, 1963; 317
- 45 **Crivellato E., Nico B., Mallardi F., Beltrami C.A., Ribatti D.** Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? *Anat Rec* 2003; 274:778-784
- 46 **de Paulis A., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F.W., Staibano S., Montuori N., Ragno P., Longobardi A., Liccardo B., Genovese A., Ribatti D., Walls A.F., Marone G.** Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J Immunol* 2006; 177:7322-31
- 47 **Devouassoux G., Foster B., Scott L.M., Metcalfe D.D., 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* 1999; 104:811-9
- 48 **Devouassoux G., Saxon A., Metcalfe D.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* 2002; 109:847-53
- 49 **Diaz-Sanchez D., Dotson A.R., Takenada H., Saxon H.** Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest* 1994; 94:1417-25
- 50 **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* 2000; 106:1140-1146
- 51 **Diaz-Sanchez D., Garcia M.P., Wang M., Jyrula M., Saxon A.** Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:1183-8
- 52 **Diaz-Sanchez D., Jyrula M., Ng D., Nel A., Saxon A.** In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1alpha, and MCP-3 in humans. *Clin Immunol.* 2000; 97:140-5
- 53 **Diaz-Sanchez D., Riedl M.** Diesel effects on human health: a question of stress? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289:722-3
- 54 **Diaz-Sanchez D., Tsien A., Casillas A., Dotson A.R., Saxon A.** Enhanced nasal cytokine production in human beings after in vivo challenge with diesel exhaust particles. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:114-23
- 55 **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* 1997; 158:2406-2413
- 56 **Dockery D.W., Pope C.A.** Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu Rev Public Health* 1994; 15:107-132
- 57 **Dreborg S., Frew A.** (Hrsg.). Allergen standardization and skin tests. Position Papers. *Allergy* 1993; 48 (suppl.) 48-82
- 58 **Duhme H., Weiland S.K., Keil U., Kraemer B., Schmid M., Stender M., Chambless L.** The association between self-reported symptoms of asthma and allergic rhinitis and self-reported traffic density on street of residence in adolescents. *Epidemiology* 1996; 7:578-82
- 59 **Dvorak A.M.** Cell biology of the basophil. *Int Rev Cytol* 1998; 180:87-236
- 60 **Dvorak A.M., Lett-Brown M., Thueson D., Grant J.A.** Complement-induced degranulation of human basophils. *J Immunol* 1981; 126:523-528
- 61 **Ebner C., Birkner T., Valenta R., Rumpold H., Breitenbach M., Scheiner O., Kraft D.** Common epitopes of birch pollen and apples-studies by western and northern blot. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:588-94
- 62 **Ebo D.G., Hagendorens M.M., Bridts C.H., Schuerwegh A.J., Dellerck L.S., Stevens W.J.** In vitro allergy diagnosis: should we follow the flow? *Clin Exp Allergy* 2004; 34:332-339
- 63 **Edwards J., Walters S., Griffiths R.K.** Hospital admissions for asthma in preschool children: relationship to major roads in Birmingham, United Kingdom. *Arch Environ Health* 1994; 49:223-7

- 64 **Ehrlich, P.** Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen. Arch Anat Physiol 1879; 166-169
- 65 **El-Nawawy A., Soliman A.T., El-Azzouni O., El-Almers S., Demian S., El-Sayed M.** Effect of passive smoking on frequency of respiratory illnesses and serum immunoglobulin-E (IgE) and interleukin-4 (IL-4) concentrations in exposed children. J Trop Pediatr 1996; 42:166-169
- 66 European Allergy White Paper. The UCB Institute of Allergy, 1997
- 67 **Fahy O., Hammad H., Senechal S., Pestel J., Tonnel A.B., Wallaert B., Tsicopoulos A.** Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: involvement of the map kinase pathway. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23:247-254
- 68 **Fahy O., Tsicopoulos A., Hammad H., Pestel J., Tonnel A.B., Wallaert B.** Effects of diesel organic extracts on chemokine production by peripheral blood mononuclear cells. J Allergy Clin Immunol 1999; 103:1115-24
- 69 **Falcone F., Haas H., Gibbs B.** The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. Blood 2000; 96:4028-38
- 70 **Falcone F.H., Zillikens D., Gibbs B.F.** The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. Exp Dermatol 2006; 15:855-64
- 71 **Ferreira F.D., Hoffmann-Sommergruber K., Breiteneder H., Pettenburger K., Ebner C., Sommergruber W., Steiner R., Bohle B., Sperr W.R., Valent P., Kungl A.J., Breitenbach M., Kraft D., Scheiner O.** Purification and characterization of recombinant Bet v I, the major birch pollen allergen. Immunological equivalence to natural Bet v I. J Biol Chem 1993; 268:19574-80
- 72 **Flowers L., Ohnishi S.T., Penning T.M.** DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon O-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and o-semiquinone anion radicals. Biochemistry 1997; 36: 8640-8648
- 73 **Friedl-Hajek R., Radauer C., O'Riordain G., Hoffmann-Sommergruber K., Leberl K., Scheiner O., Breiteneder H.** New Bet v 1 isoforms including a naturally occurring truncated form of the protein derived from Austrian birch pollen. Mol Immunol 1999; 36:639-645
- 74 **Fujimaki H., Nohara O., Ichinose T., Watanabe N., Saito S.** IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. Toxicology 1994; 92:261-8
- 75 **Fujimaki H., Saneyoshi K., Shiraishi F., Imai T., Endo T.** Inhalation of diesel

- exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology* 1997; 116:227-33
- 76 **Gassner-Bachmann M., Wüthrich B.** Bauernkinder leiden selten an Heuschnupfen und Asthma. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 125:923-931
- 77 **Gehr P., Heyer J.** Particle-lung interaction. Marcel Dekker Verlag, New York, 2000
- 78 **Genovese A., Borgia G., Björck L., Petraroli A., de Paulis A., Piazza M., Marone G.** Immunoglobulin superantigen protein L induces IL-4 and IL-13 secretion from human Fc epsilon RI⁺ cells through interaction with the kappa light chains of IgE. *J Immunol* 2003; 170:1854-1861
- 79 **Gerde P., Muggenburg B.A., Lundborg M., Dahl A.R.** The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-born carcinogen. *Carcinogenesis* 2001; 22:741-749
- 80 **Gibbs B.F., Haas H., Falcone F.H., Albrecht C., Vollrath I.B., Noll T., Wolff H.H., Amon U.** Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 1996; 26:2493-8
- 81 **Gilliland F.D., Li Y.-F., 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* 2004; 363:119-25
- 82 **Grote M., Vrtala S., Niederberger V., Valenta R., Reichelt R.** Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1140-5
- 83 **Gündel J., Schaller K.H., Angerer J.** Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a fireproof stone producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, 3-hydroxybenzo(a)anthracene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene. *Int Arch Occup Environ Health* 2000; 73:270-274
- 84 **Halken S., Hést A., Nilsson L., Taudorf E.** Passive smoking as a risk factor for the development of obstructive respiratory disease and allergic sensitization. *Allergy* 1995; 50:97-105
- 85 **Hastie R., Chir B., Heroy J.H., Levy D.A.** Basophil leucocytes and mast cells in human nasal secretions and scrapings studied by light microscope. *Lab Invest* 1979; 40:554-61

- 86 **Heinrich J., Nowak D., Wassmer G., Jorres R., Wjst M., Berger J., Magnussen H., Wichmann H.E.** Age-dependent differences in the prevalence of allergic rhinitis and atopic sensitization between an eastern and a western German city. *Allergy* 1998; 53:89-93
- 87 **Heinrich J., Richter K., Frye C., Meyer I., Wolke G., Wjst M., Nowak D., Magnussen H., Wichmann H.E.** European Community Respiratory Health Survey in Adults (ECRHS). *Pneumologie* 2002; 56:297-303
- 88 **Heinrich J., Wichmann H.E.** Traffic related pollutants in Europe and their effect on allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:341-348
- 89 **Heinrich U., Mangelsdorf I., Auerheide M., Boehncke A., Melber C., Rosner G., Höpfner U., Borken J., Pott F., Schneider K.** Durchführung eines Risikovergleichs zwischen Dieselmotoremissionen und Ottomotoremissionen hinsichtlich ihrer kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Wirkungen. UBA-FB/2/99 Berlin, Schmidt, 1999
- 90 **Heo Y., Saxon A., Hankinson O.** Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology* 2001; 159:143-58
- 91 **Hermann-Kunz E., Thierfelder W.** Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung, des Bundes, Robert Koch Institut, Berlin, 2002
- 92 **Hill R., Williams J., Tattersfield A., Britton J.** Change in use of asthma as a diagnostic label for wheezing illness in schoolchildren. *BMJ*. 1989; 299:898
- 93 **Hitzfeld B., Friedrichs K., Behrendt H.** In vitro interaction between human basophils and polymorphonuclear granulocytes: effect of airborne particulate matter. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99:390-393
- 94 **Hiura T.S., Kaszubowski M.P., Li N., Nel A.E.** Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 1999; 163:5582–5591
- 95 **Holt P.** Parasites, atopy and the hygiene hypothesis: resolutions of a paradox? *Lancet* 2000; 356:1699-1701
- 96 **Ho Q.T, Kuo C.J.** Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:1349-57
- 97 **Ishizaki T., Koizumi K., Ikemori R., Ishiyama Y., Kushibiki E.** Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy* 1987; 58:265-70
- 98 **Jacobi H.H., Poulsen L.K., Reimert C.M., Skov P.S., Ulfgren A.-K., Jones I., Elfman L.B., Malling H.-J., Mygind N.** IL-8 and the activation of eosinophils and neutrophils following nasal allergen challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;

- 116:53–59
- 99 **Jacob J., Greim H.** (Hrsg.). Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Forschungsbericht, Wiley-VCH, Weinheim 2004
- 100 **Janeway C., Travers P., Walport M., Shlomchik M.** Immunologie, 5. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 2002
- 101 **Janssen Y.M., van Houten B., Borm P.J., Mossmann B.T.** Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 1993; 69:261-74
- 102 **Jarsin R.** Swedish Petroleum Institute, Stockholm, Sweden
- 103 **Ji X., Blaszczyk J., Xiao B., O'Donnell R., Hu X., Herzog C., Singh S.V., Zimniak P.** Structure and function of residue 104 and water molecules in the xenobiotic substrate-binding site in human glutathione S-transferase P1-1. *Biochemistry* 1999; 38:10231-8
- 104 **Jouvin M.E., Adamczewski M., Numerof R., Letourneur O., Valle A., Kinet J.P.** Differential control of the tyrosine kinases lyn and syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor. *J Biol Chem* 1994; 269:5918-5925
- 105 **Juncueira L.C., Carneiro J.** Histologie. 1996; Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- 106 **Kabesch M., von Mutius E.** Adverse health effects of environmental tobacco smoke exposure in childhood. *ACI Int* 2000; 12:146-152
- 107 **Kadkhoda K., Pourfathollah A.A., Pourpak Z., Kazemnejad A.** The cumulative activity of benzo(a)pyrene on systemic immune responses with mite allergen extract after intranasal instillation and ex vivo response to ovalbumin in mice. *Toxicol Lett* 2005; 157:31-39
- 108 **Kamata H., Hirata H.** Redox regulation of cellular signalling. *Cell signal* 1999; 11:1-14
- 109 **Kästner M., Mahro B., Wienberg R.** Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. *Economia Verlag Bonn*, 1993
- 110 **Kanoh T., Suzuki T., Ishimori M., Ikeda S., Ohasawa M., Ohkuni H., Tunetoshi Y.** Adjuvant activities of pyrene, anthracene, fluoranthene and benzo(a)pyrene in production of anti-IgE antibody to Japanese cedar pollen allergen in mice. *J Clin Lab Immunol* 1996; 48:133-147
- 111 **Kaushansky K.** Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1587-92
- 112 **Kawakami T., Galli S.J.** Regulation of mast-cell and basophil function and

- survival by IgE. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:773-86
- 113 **Kay A.B., Austen K.F.** Chemotaxis of human basophil leucocytes. *Clin Exp Immunol* 1972; 11:557-63
- 114 **Kepley C.L., Lauer F.T., Oliver J.M., Burchiel S.W.** 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* 2003; 107:10-9
- 115 **Kimata H., Yoshida A., Ishioka C., Fujimoto M., Lindley I., Furusho K.** RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells. *J Exp Med* 1996; 183:2397-2402
- 116 **Kimura I., Tanizaki Y., Saito K., Takahasi K., Ueda N., Sato S.** Appearance of basophils in the sputum of patients with bronchial asthma. *Clin Allergy* 1975; 5:95-8
- 117 **Kinet J.-P.** The high affinity IgE receptor (FcεRI): From physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:931-972
- 118 **Kleeberger S.R., Reddy S.P., Zhang L.Y., Cho H.Y., Jedlicka A.E.** Toll-like receptor 4 mediates ozone-induced murine lung hyperpermeability via inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280:326-33
- 119 **Knol E.F., Mul F.P., Jansen H., Calafat J., Roos D.** Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88:328-338
- 120 **Knox R.B.** Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:354-9
- 121 **Knox R.B., Suphioglu C., Taylor P., Desai R., Watson H.C., Peng J.L., Bursill L.A.** Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:246-251
- 122 **Kobayashi H., Ishizuka T., Okayama Y.** Human mast cells and basophils as sources of cytokines. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:1205-12
- 123 **Kobayashi T., Ikeue T., Ito T., Ikeda A., Murakami M., Kato A., Maejima K., Nakajima T., Suzuki T.** Short term exposure to diesel exhaust induces nasal mucosal hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 38:166-72
- 124 **Kohlhäufel M.** Übersichtsbeiträge - Aerosolpartikel und Lunge: Grundlagen von Deposition und Clearance. *Umweltmed Forsch Prax*, Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co.KG, Landsberg, 1998; 3:90-93
- 125 **Krämer U., Altus C., Behrendt H., Dolgner R., Gutmuths F.J., Hille J.,**

- Hinrichs J., Mangold M., Paetz B., Ranft U., Röpke H., Teichmann S., Willer H.J., Schlipkötter H.W.** Epidemiologische Untersuchungen zu Auswirkungen der Luftverschmutzung auf die Gesundheit von Schulanfängern. Forum Städt Hyg 1993; 43:82-87
- 126 **Krämer U., Heinrich J., Wjst M., Wichmann H.E.** Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. Lancet 1999; 353:450-454
- 127 **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 2000;11:64-70
- 128 **Krämer U., Lemmen C.H., Behrendt H., Link E., Schäfer T., Gostomzyk J., Scherer G., Ring J.** The effect of environmental tobacco smoke on eczema and allergic sensitization in children. Br J Dermatol 2004; 150:111-118
- 129 **Kraft D., Ferreira F., Vrtala S., Breiteneder H., Ebner C., Valenta R., Susani M., Breitenbach M., Scheiner O.** The importance of recombinant allergens for diagnosis and therapy of IgE-mediated allergies. Int Arch Allergy Immunol 1999; 118:171-176
- 130 **Lambrecht B.N.** Allergen uptake and presentation by dendritic cells. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2001; 1:51-59
- 131 **Larrick J.W., Buckley C.E. 3rd, Machamer C.E., Schlagel G.D., Yost J.A., Blessing-Moore J., Levy D.** Does hyperimmunoglobulinemia-E protect tropical populations from allergic disease? J Allergy Clin Immunol 1983; 71:184-188
- 132 **Le Souef P.** Allergy in the Australian Aboriginal population. ACI Int 2000; Suppl. 1:43-45
- 133 **Lemmen C., Schober W., Buters J., Behrendt H.** Dieselruß und Allergien. Allergo J 2004;13:311-22
- 134 **Leonard E.J., Skeel A., Yoshimura T., Noer K., Kutvirt S., van Epps D.** Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. J Immunol 1990; 144:1323-30
- 135 **Lett-Brown M.A., Aelvoet M., Hooks J.J., Georgiades J.A., Thueson D.O., Grant J.A.** Enhancement of basophil chemotaxis *in vitro* by virus-induced interferon. J Clin Invest 1981; 67:547-52
- 136 **Lett-Brown M.A., Boetcher D.A., Leonard E.J.** Chemotactic responses of normal human basophils to C5a and to lymphocyte-derived chemotactic factor. J Immunol 1976; 117:246-52
- 137 **Lett-Brown M.A., Leonard E.J.** Histamine-induced inhibition of normal human basophil chemotaxis to C5a. J Immunol 1977; 118:815-8
- 138 **Lichtenstein L.M., Bochner B.S.** The role of basophils in asthma. Ann N Y Acad

- Sci 1991; 629:48-61
- 139 **Li N., Hao M., Phalen R.F., Hinds W.C., Nel, A.E.** Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clin Immunol* 2003; 109:250-265
- 140 **Lintelmann J., Fischer K., Karg E., Schröppel A.** Determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2005; 381:508-19
- 141 **Li N., Wang M., Oberley T.D., Sempf J.M., Nel A.E.** Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 2002; 169:4531-4541
- 142 **Lorentzen R.J., Ts'ou P.O.** Benzo[a]yrenedione/benzo[a]pyrenediol oxidation-reduction couples and the generation of reactive reduced molecular oxygen. *Biochemistry* 1977; 16:1467-1473
- 143 **Luttmann H., Gromping U., Kreienbrock L., Treiber-Klotzer C., Wolf-Ostermann K., Wichmann H.E.** Cohort study of respiratory tract diseases and lung function in school children in southwest Germany. 2. Regional influences on respiratory tract diseases in Mannheim and the Freiburg area. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1994; 196:114-38
- 144 **Markovic-Housley Z., Degano M., Lamba D., von Roepenack-Lahaye E., Clemens S., Susani M., Ferreira F., Scheiner O., Breiteneder H.** Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen Bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. *J Mol Biol* 2003; 325:123-33
- 145 **Matricardi P.M., Franzinelli F., Franco A., Caprio G., Murru F., Cioffi D., Ferrigno L., Palermo A., Ciccarelli N., Rosmini F.** Sibship size, birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:439-444
- 146 **May C.D.** The ancestry of allergy: Being an account of the original experimental induction of hypersensitivity recognizing the contribution of Paul Portier. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:485-495
- 147 **Melén E., Wickman M., Nordvall S.L., van Hage-Hamsten M., Lindfors A.** Influence of early and current environmental exposure factors on sensitization and outcome of asthma in pre-school children. *Allergy* 2001; 56:646-52
- 148 **Miura K., Lavens-Phillips S., MacGlashan D.W. Jr.** Localizing a control region in the pathway to leukotriene C(4) secretion following stimulation of human basophils with anti-IgE antibody. *J Immunol* 2001; 167:7027-37
- 149 **Movérare R., Westritschnig K., Svensson M., Hayek B., Bende M., Pauli G.,**

- Sorva R., Haahtela T., Valenta R., Elfman L.** Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128:325-335
- 150 **Muranaka M., Suzuki S., Koizumi K., Takafuji S., Miyamoto T., Ikemori R., Tokiwa H.** Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 77:616-623
- 151 **Naclerio R.M., Meier H.L., Kagey-Sobotka A., Adkinson N.F. Jr., Norman P.S., Lichtenstein L.M.** Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128:597-602
- 152 **Nel A.E., Diaz-Sanchez D., Ng D., Hiura T., Saxon A.** Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:539-54
- 153 **Nicholas S.W., Jean-Louis B., Ortiz B., Northridge M., Shoemaker K., Vaughan R., Rome M., Canada G., Hutchinson V.** Addressing the Childhood Asthma Crisis in Harlem: The Harlem Children's Zone Asthma Initiative. *Am J Public Health* 2005; 95:245-249
- 154 **Ninan T.K., Russell G.** Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ* 1992; 304:873-5
- 155 **Ochensberger B., Tassera L., Bifrare D., Rihs S., Dahinden C.A.** Regulation of cytokine expression and leukotriene formation in human basophils by growth factors, chemokines and chemotactic agonists. *Eur J Immunol* 1999; 29:11-22
- 156 **Okayama Y., Okumura S., Tomita H., Katayama H., Yuki K., Kagaya S., Kashiwakura J., Saito H.** Human mast cell activation through Fc receptors and Toll-like receptors. *Allergol Int* 2004; 53:227-233
- 157 **Okey A.B.** Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther* 1990; 45:241-298
- 158 **Osterlee A., Drijver M., Lebret E., Brunekreef B.** Chronic respiratory symptoms in children and adults living along streets with high traffic density. *Occup Environ Med* 1996; 53:241-7
- 159 **Pagano P., de Zaiacomo T., Scarcella E., Bruni S., Calamosca M.** Mutagenic activity of total and particle-sized fractions of urban particulate matter. *Environ Sci Technol* 1996; 30:3512-3516
- 160 **Pershagen G., Rylander E., Norberg S., Eriksson M., Nordvall S.L.** Air pollution involving nitrogen dioxide exposure and wheezing bronchitis in children. *Int J Epidemiol* 1995; 24:1147-53
- 161 **Peters A., Schulz H., Kreyling W.G., Wichmann H.E.** Staub und

- Staubinhaltsstoffe/Feine und Ultrafeine Partikel. In: Handbuch Umweltmedizin, 14. Erg. Lief., Wichmann, Schlipkötter, Fülgraff (Hrsg.), Ecomed Verlag, Landsberg, 1998
- 162 **Peters A., von Klot S., Heier M., Trentinaglia I., Hormann A., Wichmann H.E., Lowel H.** Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2004; 351:1721-30
- 163 **Phillips C., Coward W.R., Pritchard D.I., Hewitt C.R.** Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *J Leukoc Biol* 2003; 73:165-71
- 164 **Platts-Mills T.A., Ward G.W. Jr., Sporik R., Gelber L.E., Chapman M.D., Heymann P.W.** Epidemiology of the relationship between exposure to indoor allergens and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1991; 94:339-345
- 165 Pollen and Allergy. In: *Studies in Biology. The Institut of Biology* (Hrsg.), Edward Arnold Verlag, London 1997; 107 (1)
- 166 **Portier P., Richet C.** Nouveaux faits d'anaphylaxie, ou sensibilisation aux venins par doses réitérées. *R Soc Biol* 1902; 54:548-551
- 167 **Prochaska H. J., Talalay P.** Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res* 1988; 48:4776-4782
- 168 Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter Verlag, 258. Auflage, 1998
- 169 **Reed M.D., Monske M.L., Lauer F.T., Meserole S.P., Born J.L., Burchiel S.W.** Benzo[a]pyrene diones are produced by photochemical and enzymatic oxidation and induce concentration-dependent decreases in the proliferative state of human pulmonary epithelial cells. *J Toxicol Environ Health Part A* 2003; 66:1189-1205
- 170 **Richet C.** Conférence Nobel sur l'anaphylaxie. In: *Les Prix Nobel*, Norstedt, Söner (Hrsg.), Stockholm, Bibliotheca Regia Monacensis, 1914; 1-20
- 171 **Riediker M., Koller T., Monn C.** Differences in size selective aerosol sampling for pollen allergen detection using high-volume cascade impactors. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:867-73
- 172 **Riedl M., Diaz-Sanchez D.** Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:221-8
- 173 **Riedler J., Eder W., Oberfeld G., Schreuer M.** Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:194-200
- 174 **Ring J.** Allergy and modern society: does 'Western life style' promote the development of allergies? *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:7-10

- 175 **Ring J.** Allergy: a disease of modern society. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:7-10
- 176 **Ring J.** *Angewandte Allergologie*, 3. Auflage, Medizin & Wissen, Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft, München, 2004
- 177 **Ring J.** *Weißbuch der Allergie in Deutschland*, 2. Auflage, Urban und Vogel, Medien und Medizin Verlagsgesellschaft, München, 2004
- 178 **Ring J., Eberlein-König B., Behrendt H.** Environmental pollution and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001; 87:2-6
- 179 **Ring J., Krämer U., Schäfer T., Abeck D., Vieluf D., Behrendt H.** Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118:403-7
- 180 **Ring J., Krämer U., Schäfer T., Behrendt H.** Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 2001; 13:701-8
- 181 **Romagnani S.** The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 2004; 112:352-63
- 182 **Rüter A., Gunzer U.** Differentiation of granulocytes in Pappenheim stained blood cell smears using standardized cytophotometric analysis. *Blut* 1984; 48:307-20
- 183 **Rudell B., Ledin M.C., Hammarstrom U., Stjernberg N., Lundback B., Sandstrom T.** Effects on symptoms and lung function in humans experimentally exposed to diesel exhaust. *Occup Environ Med* 1996; 53:658-62
- 184 **Sainte-Laudy J., Sabbah A., Vallon C., Guerin J.C.** Analysis of anti- IgE and allergen induced human basophil activation by flow cytometry. Comparison with histamine release. *Inflamm Res* 1998; 47:401-8
- 185 **Salvi S.S., Nordenhall C., Blomberg A., Rudell B., Pourazar J., Kelly F.J., Wilson S., Sandström T., Holgate S.T., Frew, A.J.** Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:550-557
- 186 **Saxon A., Diaz-Sanchez D.** Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nat Immunol* 2005; 6:223-226
- 187 **Saxon A., Diaz-Sanchez D.** Diesel exhaust as a model xenobiotic in allergic inflammation. *Immunopharmacology* 2000; 48:325-327
- 188 **Schäfer T., Ring J.** Epidemiology of allergic diseases. *Allergy* 1997; 52:14-22
- 189 **Schäfer T., Vieluf D., Behrendt H., Kramer U., Ring J.** Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany. *Allergy* 1996; 51:532-539

- 190 **Schäfer T., Vieluf D., Behrendt H., Krämer U., Ring J.** Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of an East-West-German comparison. *Allergy* 1996; 51:532-539
- 191 **Schauer C., Niessner R., Pöschl U.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter: decadal and seasonal trends, chemical degradation, and sampling artifacts. *Environ Sci Technol* 2003; 37:2861-2868
- 192 **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* 2001; 35:71-81
- 193 **Schober W., Belloni B., Lubitz S., Eberlein-König E., Bohn P., Saritas Y., Lintelmann J., Matuschek G., Behrendt H., Buters J.** Organic extracts of urban aerosol (\leq PM_{2.5}) enhance rBet v 1-induced upregulation of CD63 in basophils from birch pollen-allergic individuals. *Toxicol Sci* 2006; 90:377-84
- 194 **Schou C.** Allergens in rhinitis. B- and T-cell epitopes of allergen molecules. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25:10-4
- 195 **Schroeder J.T., MacGlashan DW. Jr.** New concepts: the basophil. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:429-33
- 196 **Schupp A., Kaaden R., Islam M.S., Kreienbrock L., Porstmann F., Rosenlehner R., Spix C., Stiller T., Wichmann H.E.** Einfluss verkehrsabhängiger Immissionen auf Empfindlichkeit der Atemwege bei Kindern in Duisburg. *Allergologie* 1994; 12:591-597
- 197 **Seymour B.W., Pinkerton K.E., Friebertshauer K.E., Coffman R.L., Gershwin L.J.** Second-hand smoke is an adjuvant for T helper-2 responses in a murine model of allergy. *J Immunol* 1997; 159:6169-6175
- 198 **Shimada T.** Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21:257-276
- 199 **Shute J.** Basophil migration and chemotaxis. *Clin Exp Allergy* 1992; 22:321-3
- 200 **SRU - Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen.** *Umwelt und Gesundheit. Sondergutachten*, Metzler-Poeschel Verlag, Stuttgart, 1999
- 201 **Stanley R.G., Linskens H.F.** (Hrsg). *Pollen. Biology-Biochemistry-Management*. Berlin, Springer Verlag, 1974
- 202 **Straif K., Baan R., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Cogliano V.** Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncol* 2005; 6:931-932
- 203 **Strannegård Ö., Strannegård I.L.** The causes of the increasing prevalence of allergy: is atopy a microbial deprivation disorder? *Allergy* 2001; 56:91-102

- 204 **Studnicka M., Hackl E., Pischinger J., Fangmeyer C., Haschke N., Kuhr J., Urbanek R., Neumann M., Frischer T.** Traffic-related NO₂ and the prevalence of asthma and respiratory symptoms in seven year olds. *Eur Respir J* 1997; 10:2275-8
- 205 **Sutton B.J., Gould H.J.** The human IgE network. *Nature* 1993; 366:421-428
- 206 **Suzuki S., Kanoh T.** The adjuvant activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice. *Jpn J Allergol* 1993; 42:936-8
- 207 **Swoboda I., Jilek A., Ferreira F., Engel E., Hoffmann-Sommergruber K., Scheiner O., Kraft D., Breiteneder H., Pittenauer E., Schmid E., Vicente O., Heberle-Bors E., Ahorn H., Breitenbach M.** Isoforms of Bet v 1, the major birch pollen allergen, analyzed by liquid chromatography, mass spectrometry, and cDNA cloning. *J Biol Chem* 1995; 270:2607-2613
- 208 **Taguchi K., Fujii S., Yamano S., Cho A.K., Kamisuki S., Nakai Y., Sugawara F., Froines J.R., Kumagai Y.** An approach to evaluate two-electron reduction of 9,10-phenanthraquinone and redox activity of the hydroquinone associated with oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2007;43:789-99
- 209 **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* 1997; 156:36-42
- 210 **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* 1995; 95:103-15
- 211 **Taylor P.E., Flagan R.C., Valenta R., Glovsky M.M.** Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:51-6
- 212 **Taylor P.E., Jonsson H.** Thunderstorm asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004; 4:409-13
- 213 **Terada N., Maesako K., Hiruma K., Hamano N., Houki G., Konno A., Ikeda T., Sai M.** Diesel exhaust particulates enhance eosinophil adhesion to nasal epithelial cells and cause degranulation. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 114:167-174
- 214 **To-Figueras J., Gene M., Gomez-Catalan J., Galan M.C., Fuentes M., Ramon J.M., Rodamilans M., Huguet E., Corbella J.** Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis* 1997; 18:1529-33
- 215 **Tohami T., Drucker L., Radnay J., Shapira H., Lishner M.** Expression of

- tetraspanins in peripheral blood leukocytes: a comparison between normal and infectious conditions. *Tissue Antigens* 2004; 64:235-242
- 216 **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. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1153-1160
- 217 **Tsien A., Diaz-Sanchez D., Ma J., Saxon A.** The organic component of diesel exhaust particles and phenanthrene, a major polyaromatic hydrocarbon constituent, enhances IgE production by IgE-secreting EBV-transformed human B cells in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142:256-63
- 218 US Environmental Protection Agency (EPA). Air Emissions Species Manual, Volume II, Particulate Matter Species Profiles. 1988; EPA-450/2-88-003b
- 219 **Valent P., Bettelheim P.** The human basophil. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990; 10:327-52
- 220 **Valenta R., Breiteneder H., Petternburger K., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D., Scheiner O.** Homology of the major birch-pollen allergen, Bet v I, with the major pollen allergens of alder, hazel, and hornbeam at the nucleic acid level as determined by cross-hybridization. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:677-82
- 221 **Valenta R., Niederberger V.** Recombinant allergens for immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:826-30
- 222 **van Vliet P., Knappe M., de Hartog J., Janssen N., Harssema H., Brunekreef B.** Motor vehicle exhaust and chronic respiratory symptoms in children living near freeways. *Environ Res* 1997; 74:122-32
- 223 **van Zijverden M., van der Pijl A., Bol M., van Pinxteren F.A., de Haar C., Penninks A.H., van Loveren H., Pieters R.** Diesel exhaust, carbon black, and silica particles display distinct Th1/Th2 modulating activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 168:131-9
- 224 **von Mutius E., Fritzsche C., Weiland S.K., Roll G., Magnussen H.** Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: A descriptive comparison. *BMJ* 1992; 305:1395-1399
- 225 **von Mutius E., Martinez F.D., Fritzsche C., Nicolai T., Reitmeir P., Thiemann H.H.** Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 1994; 308:692-695
- 226 **von Mutius E., Weiland S.K., Fritzsche C., Duhme H., Keil U.** Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet* 1998; 351:862-866
- 227 **von Pirquet C.** Allergie. *Münch Med Wochensch* 1906; 30:1457-1458 (4)
- 228 **von Pirquet C., Schick B.** Die Serum Krankheit. Baltimore, Williams and Wilkins

- Company, 1905
- 229 **Waldron G., Pottle B., Dod J.** Asthma and the motorways – one district's experience. *J Public Health Med* 1995; 17:85-9
- 230 **Wan J., Diaz-Sanchez D.** Phase II enzymes induction blocks the enhanced IgE production in B cells by diesel exhaust particles. *J Immunol* 2006; 177:3477-83
- 231 **Wang Y., Spitz M.R., Schabath M.B., Ali-Osman F., Mata H., Wu X.** Association between glutathione S-transferase p1 polymorphisms and lung cancer risk in Caucasians: a case-control study. *Lung Cancer* 2003; 40:25-32
- 232 **Waser M., Michels K.B., Bieli C., Flöistrup H., Pershagen G., von Mutius E., Ege M., Riedler J., Schram-Bijkerk D., Brunekreef B., van Hage M., Lauener R., Braun-Fahrländer C.; PARSIFAL Study team.** Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:661-70
- 233 **Waser M., von Mutius E., Riedler J., Nowak D., Maisch S., Carr D., Eder W., Tebow G., Schierl R., Schreuer M., Braun-Fahrländer C., the ALEX Study team.** Exposure to pets, and the association with hay fever, asthma, and atopic sensitization in rural children. *Allergy* 2005; 60:177-84
- 234 **Weiland S.K., Mundt K.A., Ruckmann A., Keil U.** Self-reported wheezing and allergic rhinitis in children and traffic density on street of residence. *Ann Epidemiol* 1994; 4:243-7
- 235 **Weiland S.K., von Mutius E., Hirsch T., Duhme H., Fritzsche C., Werner B., Husing A., Stender M., Renz H., Leupold W., Keil U.** Prevalence of respiratory and atopic disorders among children in the East and West of Germany five years after unification. *Eur Respir J* 1999; 14:862-70
- 236 **Westerholm R., Christensen A., Tornqvist M., Ehrenberg L., Rannug U., Sjogren M., Rafter J., Soontjens C., Almen J., Gragg K.** Comparison of exhaust emissions from Swedish environmental classified diesel fuel (MK1) and European Program on Emissions, Fuels and Engine Technologies (EPEFE) reference fuel: a chemical and biological characterization, with viewpoints on cancer risk. *Environ Sci Technol* 2001; 35:1748-54
- 237 **Whitekus M.J., Li N., Zhang M., Wang M., Horwitz M.A., Nelson S. K., Horwitz L.D., Brechun N., Diaz-Sanchez D., Nel A.E.** Thiol antioxidants inhibit the adjuvant effects of aerosolized diesel exhaust particles in a murine model for ovalbumin sensitization. *J Immunol* 2002; 168:2560-2567
- 238 **Whitlock J.P.** Induction of cytochrome P4501A1. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:103-125
- 239 **Wichmann H.** Environment, life-style and allergy: the German answer. *Allergo J*

- 1995; 4:315-316
- 240 **Wichmann H.E., Spix C., Tuch T., Wolke G., Peters A., Heinrich J., Kreyling W.G., Heyder J.** Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst* 2000; 98:5-86
- 241 **Wjst M., Reitmeir P., Dold S., Wulff A., Nicolai T., von Loeffelholz-Colberg E.F., von Mutius E.** Road traffic and adverse effects on respiratory health in children. *BMJ* 1993; 307:596-600
- 242 Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998; 351:1225-32
- 243 **Wüthrich B.** Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 90:3-10
- 244 **Wüthrich B., Schindler C., Leuenberger P., Ackermann-Liebrich U.** Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106:149-56
- 245 **Xiao G.G., Wang M., Li N., Loo J.A., Nel A.E.** Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem* 2003; 278:50781-90
- 246 **Yanagisawa R., Takano H., Inoue KI., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S., Yamaki K., Yoshikawa T., Hayakawa K.** Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:386-95
- 247 **Zetterström O., Nordvall S.L., Bjørksteån B., Ahlsted S., Selander M.** Increased antibody responses in rats exposed to tobacco smoke. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75:594-598
- 248 **Zou L., Atkinson S.** Characterising vehicle emissions from the burning of biodiesel made from vegetable oil. *Environ Technol* 2003; 24:1253-60

V Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Behrendt, der Leiterin des Zentrum Allergie und Umwelt, für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung. Außerdem danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Schwab für seine Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Bei Prof. Dr. Jeroen Buters und bei Dr. Wolfgang Schober möchte ich mich herzlich bedanken für die gemeinsame Gestaltung des Themas, die vielen fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, für ihre Kritik, ihr Lob und ihre Ermutigung. Bei der Umsetzung des Themas hatte ich außerdem maßgebliche Hilfe von Antje Wallmuth, mit deren Unterstützung unter anderem die Etablierung der Zellisolationmethoden und der ELISAs gelingen konnte. Aber nicht nur für die effektive Zusammenarbeit, sondern auch für die gute gemeinsame Zeit möchte ich mich bei Jeroen, Wolfgang und Antje bedanken.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des ZAUM danke ich herzlich für die stets ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre und ihre vielfältige Unterstützung. Ganz besonders nennen möchte ich hier meine Kolleginnen Dr. Stefanie Förster, Dr. Stefanie Gilles, Dr. Cornelia Blume und Gudrun Gebauer, die mich bei den täglichen Sorgen im Laboralltag nie alleine ließen.

Auch zu Dank verpflichtet bin ich den Ärztinnen und Ärzten des Klinikums am Biederstein und den Mitarbeiterinnen im Allergielabor für die zahllosen Blutentnahmen und ihre Unterstützung bei der allergischen Diagnostik. Für die Zusammenarbeit bei der Tryptasemessung möchte ich mich besonders bei Johanna Grosch bedanken. Für die Einarbeitung in den Basophilenaktivierungstest und in die Technik der FACS-Messungen danke ich Dr. Benedetta Belloni.

Bei Renate Effner möchte ich mich für die Mitarbeit im Rahmen ihres Praktikums und den engagierten Arbeitseinsatz bei der Genotypisierung der Birkenpollenallergiker bedanken. Christine Weil und Dr. Ingrid Weichenmeier danke ich für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von basophilen Granulozyten.

Bei allen Korrekturlesern bedanke ich mich vielmals für die wertvollen fachlichen und grammatikalischen Verbesserungsvorschläge.

Bei meinem Freund bedanke ich mich für sein Interesse an meiner Tätigkeit, seine Motivation und besonders für seine technische Hilfe in der Endphase der Arbeit.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie, Gabriele, Reinhard und Tobias Lubitz, die mich in all den Jahren begleitet und in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben. Deshalb möchte ich ihnen diese Arbeit widmen.

VI Lebenslauf

Name: Lubitz
Vornamen: Stefanie Christina
Geburtsdatum/-ort: 05.11.1977 in Nürnberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch



Berufliche Tätigkeit

seit 01/2008 Hexal AG, Holzkirchen
Projektmanagerin
Abteilung Expert Reports/Tox. Assessment

Promotion

09/2002-05/2007 Promotion am Zentrum Allergie und Umwelt der TU München unter der Leitung von Prof. Dr. Behrendt; wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bereich Molekulare Toxikologie und Expositionsforschung
Thema der Dissertation: Einfluss polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe auf die allergische Typ I - Reaktion: Studien an basophilen Granulozyten von Birkenpollenallergikern

Hochschulausbildung

06/2007 – 11/2007 Lebensmittelchemisches Praktikum am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit; Abschluss: 2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
11/1997 – 11/2001 Studium der Lebensmittelchemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Abschluss: 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

Weiterbildung

seit 09/2004 Weiterbildung „Fachtoxikologin DGPT“ der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

Schulbildung

09/1988 – 06/1997 Neues Gymnasium Nürnberg; Abschluss: Abitur
09/1984 – 07/1988 Grundschule Fischbacher Hauptstraße

VII Anhang

Verzeichnis der Tabellen

Tab.1	Klassifizierung von Aerosolpartikeln gemäß ihrer Teilchengröße	S. 11
Tab.2	Charakterisierung der Birkenpollenallergiker	S. 30
Tab.3	Charakterisierung der Kontrollen	S. 30
Tab.4	Beurteilung der CAP-Klassen	S. 38
Tab.5	Unterschiedliche Färbungen von Zellbestandteilen durch Pappenheim-Färbung	S. 45
Tab.6	Basophilenstimulation	S. 46
Tab.7	Färbungen zur Bestimmung der in der aufgereinigten Fraktion enthaltenen Zelltypen	S. 63
Tab.8	Ergebnisse Protein-Array	S. 67
Tab.9	Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse	S. 78
Tab.10	Genotypisierung der Birkenpollenallergiker	S. 80
Tab.11	Darstellung der High Responder und Low Responder	S. 81

Verzeichnis der Abbildungen

Abb.1	Klassifikation der allergischen Immunantwort in 4 Typen	S. 3
Abb.2	Determinanten allergischer Erkrankungen	S. 6
Abb.3	PM ₁₀ -Emissionen in Bayern im Jahr 2000	S. 11
Abb.4	Dieselfußpartikel-Agglomerate	S. 13
Abb.5	Zusammensetzung von Dieselfußpartikeln	S. 14
Abb.6	16 PAKs der U.S. Environmental Protection Agency (EPA)	S. 17
Abb.7	Birkenpollen	S. 19
Abb.8	humaner basophiler Granulozyt	S. 22
Abb.9	schematische Darstellung der Aktivitäten basophiler Granulozyten nach Binden eines Antigens	S. 24
Abb.10	Basophilenaktivierungstest	S. 26
Abb.11	Schema des Basophilenaktivierungstest	S. 40
Abb.12	Durchflusszytometrische Bestimmung der Basophilenaktivierung	S. 41
Abb.13	PBMC-Isolierung durch Dichtegradientenzentrifugation	S. 42
Abb.14	UV-Spektrum 9,10-Diacetoxy-Phenanthren	S. 47
Abb.15	HPLC-Chromatogramm 9,10-Diacetoxy-Phenanthren	S. 47
Abb.16	UV-Spektrum 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	S. 48
Abb.17	HPLC-Chromatogramm 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	S. 48
Abb.18	Prinzip des Zytokin-Antikörper-Arrays	S. 49
Abb.19	schematische Darstellung des Migrationsassays	S. 54
Abb.20	Gensequenz des <i>GSTP1</i> Gens	S. 55
Abb.21	Beispiel für die allelische Diskriminierung des <i>GSTP1</i> -Polymorphismus	S. 56

Abb.22	Dosis-Wirkungsbeziehung der rBet v 1-induzierten CD63-Expression der 12 Birkenpollenallergiker	S. 59
Abb.23	Basophilenaktivierung	S. 60
Abb.24	Einfluss von PAKs auf die rBet v 1-induzierte CD63-Expression bei 6 Birkenpollenallergikern	S. 61
Abb.25	Einfluss von PAKs auf die rBet v 1-induzierte CD63-Expression; Mittelwerte	S. 62
Abb.26	Einfluss des EPA-PAK-Standards und DMSO auf die rBet v 1 induzierte CD63-Expression bei Nichtallergikern	S. 62
Abb.27	Dosis-Wirkungsbeziehung der Basophilenaktivierung durch den EPA-PAK-Standard	S. 63
Abb.28	Angereicherte basophile Granulozyten im Lichtmikroskop	S. 64
Abb.29	Beispiel für die durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils basophiler Granulozyten	S. 64
Abb.30	Bestimmung des Anteils PI ⁺ - Zellen nach MACS-Säulenaufreinigung von PBMCs, Beispiel Proband II	S. 65
Abb.31	Vollblut: Identifizierung der unterschiedlichen Blutzellen durch Pappenheim-Färbung	S. 66
Abb.32	angereicherte Basophilen: Pappenheim-Färbung	S. 66
Abb.33	Human Cytokine Antibody Array	S. 67
Abb.34	IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM Phenanthren oder Benzo[a]pyren	S. 70
Abb.35	IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM Phenanthren oder Benzo[a]pyren	S. 71
Abb.36	Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM Phenanthren oder Benzo[a]pyren	S. 72
Abb.37	Histamin-Freisetzung nach Aufschluss der Zellen mit Triton-X	S. 72
Abb.38	Dosisabhängige Mediator-Freisetzung durch Benzo[a]pyren und Phenanthren	S. 73
Abb.39	Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM Phenanthren oder Benzo[a]pyren	S. 74
Abb.40	IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 µM 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	S. 75
Abb.41	IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 µM 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	S. 75
Abb.42	Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 µM 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	S. 76
Abb.43	Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µM 9,10-Diacetoxy-Phenanthren oder 0,1 µM 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon	S. 76
Abb.44	IL-4-, IL-8-, Histamin- und Tryptase-Freisetzung durch Basophile nichtallergischer Kontrollpersonen	S. 77
Abb.45	Migration der Neutrophilen durch Basophilenüberstände und Bestimmung der chemotaktischen Wirkungsschwelle von IL-8	S. 79

rBet v 1-Titration (Daten zu Abb.22)

<i>rBet v 1 -Konzentration [ng/ml]</i>	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>			
	Patientin I	Patient II	Patientin III	Patientin IV
4545,5		82,8		
454,55	72,0	84,2	92,6	74,2
45,454	88,8	81,9	97,8	71,6
4,5454	81,1	85,8	93,2	81,8
0,4545	64,2	37,5	20,5	45,2
0,0454	2,6	7,3	1,4	3,0
0,0045	3,2	5,2	1,6	2,0
0,001	4,2	3,6	3,3	2,5

<i>rBet v 1 - Konzentration [ng/ml]</i>	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>
	Patient V
207	97,8
20,7	97,6
2,07	81,7
0,207	19,7
0,0207	4,8
0,00207	4,5

<i>rBet v 1 - Konzentration [ng/ml]</i>	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>			
	Patientin VI	Patient VII	Patientin VIII	Patient IX
4545,5	36,4		61,1	34,2
454,55	28,6		84,5	36,9
45,454	40,2	59,5	86,8	42,2
4,5454	41,6	23,5	92,0	49,5
0,4545	12,1	5,0	79,4	50,8
0,0454	1,9		20,9	9,9
0,0045			2,9	1,2
0,001			1,5	1,4

<i>rBet v 1 -Konzentration [ng/ml]</i>	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>		
	Patient X	Patient XI	Patient XII
4545,5	97,4		
454,55	97,0		
45,454	98,0	94,1	
4,5454	96,1	97,0	56,2
0,4545	75,4	79,8	26,2
0,0454	6,5	10,4	15,7
0,0045	3,6	1,4	9,1
0,001			

Einfluss der EPA-PAKs auf die rBet v 1-induzierte Basophilenaktivierung bei maximaler Dosis-Wirkungskonzentration (Daten zu Abb.24 und 25)

	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>		
	Patientin I 0,27 ng/ml rBet v 1 7,2 ng/ml EPA-PAK	Patient II 0,36 ng/ml rBet v 1 7,2 ng/ml EPA-PAK	Patientin III 0,23 ng/ml rBet v 1 1,76 ng/ml EPA-PAK
Medium	0,69	0,33	1,11
fMLP	30,76	15,92	11,65
rBet v 1	22,91	12,18	17,37
EPA-PAK	1,62	1,43	2,37
DMSO	2,03	1,23	5,13
rBet v 1 + EPA-PAK	35,11	81,16	76,81
rBet v 1 + DMSO	13,07	13,95	15,96

	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>		
	Patientin IV 0,36 ng/ml rBet v 1 0,007 ng/ml EPA-PAK	Patient V 0,18 ng/ml rBet v 1 0,37 ng/ml EPA-PAK	Patientin VI 45,45 ng/ml rBet v 1 0,54 ng/ml EPA-PAK
Medium	1,31	2,29	1,17
fMLP	19,57	50,35	15,34
rBet v 1	9,65	53,47	26,23
EPA-PAK	6,59	2,73	1,34
DMSO	1,28	2,44	1,99
rBet v 1 + EPA-PAK	94,64	67,85	38,07
rBet v 1 + DMSO	12,86	47,95	22,63

**Einfluss der EPA-PAKs auf die Basophilenaktivierung: Negativkontrollen
(Abb.26)**

	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>		
	Kontrolle 2 45,45 ng/ml rBet v 1	Kontrolle 6 45,45 ng/ml rBet v 1	Kontrolle 7 45,45 ng/ml rBet v 1
Medium	2,05	1,10	1,63
fMLP	12,73	28,16	15,28
rBet v 1	1,46	1,31	1,12
rBet v 1 + EPA-PAK 545 ng/ml	2,24	1,01	1,14
rBet v 1 + EPA-PAK 364 ng/ml	1,85	0,80	0,92
rBet v 1 + EPA-PAK 182 ng/ml	1,36	1,11	1,55
rBet v 1 + EPA-PAK 72,7 ng/ml	1,69	0,60	1,14
rBet v 1 + EPA-PAK 54,5	1,20	0,80	0,53
rBet v 1 + EPA-PAK 36,4	1,40	1,20	1,26
rBet v 1 + EPA-PAK 18,2	2,00	0,70	1,70
rBet v 1 + EPA-PAK 7,27	1,50	1,10	0,95
rBet v 1 + EPA-PAK 5,45	1,90	1,20	1,80
rBet v 1 + EPA-PAK 3,64	2,75	0,60	1,47
rBet v 1 + EPA-PAK 1,82	1,30	1,60	2,34
rBet v 1 + EPA-PAK 0,727	1,30	1,61	1,15
rBet v 1 + EPA-PAK 0,545	1,50	1,50	1,57
rBet v 1 + EPA-PAK 0,364	1,79	0,59	1,32
rBet v 1 + EPA-PAK 0,182	0,80	0,30	0,82
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0727	1,80	0,69	1,34
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0545	1,99	0,79	1,53
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0364	1,30	0,40	1,23
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0182	1,99	1,09	1,46
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00727	3,00	0,69	0,52
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00545	1,90	0,69	0,93
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00364	1,70	0,39	1,33
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00182	2,20	0,49	1,02
rBet v 1 + EPA-PAK 0,000727	1,29	0,30	1,03

	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>	
	Kontrolle 8 45,45 ng/ml rBet v 1	Kontrolle 9 45,45 ng/ml rBet v 1
Medium	3,73	1,20
fMLP	57,35	16,08
rBet v 1	2,91	1,62
rBet v 1 + EPA-PAK 545 ng/ml	3,31	0,70
rBet v 1 + EPA-PAK 364 ng/ml	3,13	1,42
rBet v 1 + EPA-PAK 182 ng/ml	2,93	1,61
rBet v 1 + EPA-PAK 72,7 ng/ml	3,08	1,52
rBet v 1 + EPA-PAK 54,5	1,92	1,62
rBet v 1 + EPA-PAK 36,4	3,96	1,31
rBet v 1 + EPA-PAK 18,2	3,42	2,03
rBet v 1 + EPA-PAK 7,27	3,40	1,82
rBet v 1 + EPA-PAK 5,45	3,65	2,24
rBet v 1 + EPA-PAK 3,64	3,02	0,91
rBet v 1 + EPA-PAK 1,82	2,33	1,71
rBet v 1 + EPA-PAK 0,727	2,15	1,91
rBet v 1 + EPA-PAK 0,545	3,82	1,20
rBet v 1 + EPA-PAK 0,364	3,12	1,82
rBet v 1 + EPA-PAK 0,182	1,61	2,31
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0727	2,53	2,11
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0545	2,02	1,82
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0364	2,22	1,53
rBet v 1 + EPA-PAK 0,0182	1,60	1,42
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00727	2,58	0,80
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00545	1,76	1,62
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00364	1,66	2,03
rBet v 1 + EPA-PAK 0,00182	2,79	1,31
rBet v 1 + EPA-PAK 0,000727	2,41	1,13

**Einfluss der EPA-PAKs auf die rBet v 1-induzierte Basophilenaktivierung:
Dosis-Wirkungsbeziehungen (Daten zu Abb.27)**

	<i>CD63⁺-Basophile [%]</i>	
	Patient II 15.10.2004 0,36 ng/ml rBet v 1	Patient II 18.9.2006 0,36 ng/ml rBet v 1
rBet v 1	12,18	rBet v 1 52,93
rBet v 1 + EPA-PAK 0,4 ng/ml	40,52	rBet v 1 + EPA-PAK 0,003 ng/ml 59,70
rBet v 1 + EPA-PAK 0,7 ng/ml	66,87	rBet v 1 + EPA-PAK 0,006 ng/ml 66,84
rBet v 1 + EPA-PAK 3,7 ng/ml	70,63	rBet v 1 + EPA-PAK 0,008 ng/ml 62,31
rBet v 1 + EPA-PAK 7,2 ng/ml	81,16	rBet v 1 + EPA-PAK 0,016 ng/ml 43,62
rBet v 1 + EPA-PAK 36,8 ng/ml	12,73	rBet v 1 + EPA-PAK 0,032 ng/ml 45,27

ELISA-Ergebnisse: Birkenpollenallergiker

IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren oder Benzo[a]pyren und rBet v 1 (Daten zu Abb.34)

IL-4-Freisetzung in pg/ml						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	3,98	4,24	4,18	4,10	5,32	0,00
II	38,63	33,34	15,55	16,48	13,97	0,00
III	1,97	2,00	1,85	1,78	1,20	0,00
V	6,18	5,53	5,69	5,51	2,82	0,00
VI	1,50	1,34	1,64	1,48	1,08	0,00
VII	10,81	7,58	9,39	11,67	5,54	0,00
VIII	2,50	2,73	2,15	2,40	1,83	0,00
IX	3,69	2,88	3,37	3,09	2,71	0,00
X	4,36	5,40	4,95	5,67	3,86	0,00
XI	1,31	1,43	1,44	1,43	1,40	0,00
XII	4,75	4,17	3,80	3,91	3,20	0,00
Mittelwerte	7,24	6,42	4,91	5,23	3,90	0,00
StabW	10,7	9,1	4,2	4,7	3,7	0,0
LN-Werte						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1			
I	1,38	1,44	1,43			
II	3,65	3,51	2,74			
III	0,68	0,69	0,62			
V	1,82	1,71	1,74			
VI	0,41	0,29	0,49			
VII	2,38	2,03	2,24			
VIII	0,92	1,00	0,77			
IX	1,31	1,06	1,21			
X	1,47	1,69	1,60			
XI	0,27	0,36	0,36			
XII	1,56	1,43	1,34			
t-Test	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1				
	0,2009	0,4761				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	95,2	101,4	100,0	98,1	129,8	0,0
II	248,4	214,4	100,0	106,0	84,8	0,0
III	106,5	108,1	100,0	96,2	67,4	0,0
V	108,6	97,2	100,0	96,8	51,2	0,0
VI	91,5	81,7	100,0	90,2	73,0	0,0
VII	115,1	80,7	100,0	124,3	47,5	0,0
VIII	116,3	127,0	100,0	111,6	76,3	0,0
IX	109,5	85,5	100,0	91,7	87,7	0,0
X	88,1	109,1	100,0	114,5	68,1	0,0
XI	91,0	99,3	100,0	99,3	97,9	0,0
XII	125,0	109,7	100,0	102,9	81,8	0,0
Mittelwerte	117,74	110,38	100,00	102,88	78,67	0,00
StabW	45,0	37,2	0,0	10,4	22,6	0,0

IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ molar Phenanthren oder Benzo[a]pyren ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.34)

IL-4-Freisetzung in pg/ml					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	3,30	3,10	3,07	5,32	0,00
II	46,75	43,34	14,86	13,97	0,00
III	2,05	1,90	1,51	1,20	0,00
V	4,79	5,10	4,67	2,82	0,00
VI	1,41	1,12	1,28	1,08	0,00
VII	4,95	7,48	4,74	5,54	0,00
VIII	1,89	2,20	1,58	1,83	0,00
IX	3,11	3,29	2,91	2,71	0,00
X	5,50	5,54	4,47	3,86	0,00
XI	1,86	1,47	1,24	1,40	0,00
XII	3,51	4,26	3,41	3,20	0,00
Mittelwerte	7,19	7,16	3,98	3,90	0,00
StabW	13,2	12,2	3,9	3,7	0,0
LN-Werte					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO		
I	1,19	1,13	1,12		
II	3,84	3,77	2,70		
III	0,72	0,64	0,41		
V	1,57	1,63	1,54		
VI	0,34	0,11	0,25		
VII	1,60	2,01	1,56		
VIII	0,64	0,79	0,46		
IX	1,13	1,19	1,07		
X	1,70	1,71	1,50		
XI	0,62	0,39	0,22		
XII	1,26	1,45	1,23		
t-Test	B[a]P	Phe			
	0,039	0,023			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	107,5	101,0	100,0	173,3	0,0
II	314,6	291,7	100,0	94,0	0,0
III	135,8	125,8	100,0	79,5	0,0
V	102,6	109,2	100,0	60,4	0,0
VI	110,2	87,5	100,0	84,4	0,0
VII	104,4	157,8	100,0	116,9	0,0
VIII	119,6	139,2	100,0	115,8	0,0
IX	106,9	113,1	100,0	93,1	0,0
X	123,0	123,9	100,0	86,4	0,0
XI	150,0	118,5	100,0	112,9	0,0
XII	102,9	124,9	100,00	93,8	0,0
Mittelwerte	134,32	135,70	100,0	100,95	0,00
StabW	61,7	55,0	0,0	29,3	0,0

**IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren-9,10-Hydrochinon
oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon und rBet v 1 (Daten zu Abb.40)**

IL-4-Freisetzung in pg/ml						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	3,16	4,03	4,18	4,10	5,32	0,00
III	2,05	2,44	1,85	1,78	1,20	0,00
V	3,23	6,73	5,69	5,51	2,82	0,00
IX	2,83	3,30	3,37	3,09	2,71	0,00
X	3,19	5,38	4,95	5,67	3,86	0,00
XI	1,12	1,47	1,44	1,43	1,40	0,00
XII	4,62	4,20	3,80	3,91	3,20	0,00
Mittelwerte	2,89	3,94	3,61	3,64	2,93	0,00
StabW	1,1	1,8	1,5	1,7	1,4	0,0
LN-Werte						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1			
I	1,51	1,39	1,43			
III	0,72	0,89	0,62			
V	1,17	1,91	1,74			
IX	1,04	1,19	1,21			
X	1,16	1,68	1,60			
XI	0,11	0,39	0,36			
XII	1,53	1,44	1,34			
t-Test	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1				
	0,0987	0,0910				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	75,6	96,4	100,0	98,1	129,8	0,0
III	110,8	131,9	100,0	96,2	67,4	0,0
V	56,8	118,3	100,0	96,8	51,2	0,0
IX	84,0	97,9	100,0	91,7	87,7	0,0
X	64,4	108,7	100,0	114,5	68,1	0,0
XI	77,8	102,1	100,0	99,3	97,9	0,0
XII	121,6	110,5	100,0	102,9	81,8	0,0
Mittelwerte	84,42	109,40	100,00	99,94	83,41	0,00
StabW	23,7	12,5	0,0	7,3	25,5	0,0

**IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren-9,10-Hydrochinon
oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.40)**

IL-4-Freisetzung in pg/ml					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	2,40	2,84	3,07	5,32	0,00
III	1,78	1,90	1,51	1,20	0,00
V	2,21	4,48	4,67	2,82	0,00
IX	2,76	3,07	2,91	2,71	0,00
X	2,99	5,30	4,47	3,86	0,00
XI	1,07	1,28	1,24	1,40	0,00
XII	4,12	3,20	3,41	3,20	0,00
Mittelwerte	2,48	3,15	3,04	2,93	0,00
StabW	1,0	1,4	1,3	1,4	0,0
LN-Werte					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO		
I	0,88	1,04	1,12		
III	0,58	0,64	0,41		
V	0,79	1,50	1,54		
IX	1,02	1,12	1,07		
X	1,10	1,67	1,50		
XI	0,07	0,25	0,22		
XII	1,42	1,16	1,23		
t-Test	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,203	0,373			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	78,2	92,5	100,0	173,3	0,0
III	117,9	125,8	100,0	79,5	0,0
V	47,3	95,9	100,0	60,4	0,0
IX	94,8	105,5	100,0	93,1	0,0
X	66,9	118,6	100,0	86,4	0,0
XI	86,3	103,2	100,0	112,9	0,0
XII	120,8	93,8	100,0	93,8	0,0
Mittelwerte	87,46	105,06	100,00	99,91	0,00
StabW	26,5	12,8	0,0	36,1	0,0

**IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren oder Benzo[a]pyren
und rBet v 1 (Daten zu Abb.35)**

IL-8-Freisetzung in pg/ml						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	58,6	54,3	48,0	52,2	40,0	0,00
II	266,6	224,8	177,0	165,0	171,3	0,00
III	20,9	21,1	16,4	18,9	11,0	0,00
V	32,0	23,9	23,9	21,3	16,5	0,00
VI	18,5	14,7	10,5	12,2	10,1	0,00
VIII	20,4	17,1	11,0	15,3	9,5	0,00
IX	19,7	16,0	16,9	14,9	10,1	0,00
X	48,8	44,1	36,1	33,7	36,4	0,00
XI	374,3	306,9	317,4	320,3	317,3	0,00
XII	95,5	85,7	88,2	93,4	48,7	0,00
Mittelwerte	95,53	80,87	74,55	74,72	67,09	0,00
StabW	123,6	101,8	99,6	98,9	100,6	0,0
LN-Werte						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1			
I	4,07	3,99	3,87			
II	5,59	5,42	5,18			
III	3,04	3,05	2,80			
V	3,46	3,18	3,18			
VI	2,92	2,69	2,35			
VIII	3,02	2,84	2,40			
IX	2,98	2,77	2,83			
X	3,89	3,79	3,59			
XI	5,93	5,73	5,76			
XII	4,56	4,45	4,48			
t-Test	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1				
	0,0004	0,0249				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	122,1	113,1	100,0	108,8	83,3	0,0
II	150,6	127,0	100,0	93,2	96,8	0,0
III	127,4	128,7	100,0	115,2	67,1	0,0
V	133,6	100,0	100,0	89,0	68,9	0,0
VI	176,2	140,0	100,0	116,2	96,2	0,0
VIII	185,2	155,6	100,0	138,9	86,3	0,0
IX	116,6	94,7	100,0	88,2	59,8	0,0
X	135,2	122,2	100,0	93,4	100,8	0,0
XI	117,9	96,7	100,0	100,9	100,0	0,0
XII	108,3	97,2	100,0	105,9	55,2	0,0
Mittelwerte	137,31	117,50	100,00	104,96	81,43	0,00
StabW	25,8	20,8	0,0	15,7	17,4	0,0

**IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit mit 1 µmolar Phenanthren oder
Benzo[a]pyren ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.35)**

IL-8-Freisetzung in pg/ml					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	46,7	54,7	37,4	40,0	0,00
II	285,0	271,2	171,1	171,3	0,00
III	11,0	7,4	7,5	11,0	0,00
V	22,7	22,3	26,2	16,5	0,00
VI	13,5	10,9	12,5	10,1	0,00
VIII	14,8	19,7	9,9	9,5	0,00
IX	20,7	19,2	12,5	10,1	0,00
X	51,2	44,1	34,5	36,4	0,00
XI	375,6	333,2	282,5	317,3	0,00
XII	65,4	57,3	56,8	48,7	0,00
Mittelwerte	90,66	84,00	65,09	67,09	0,00
StabW	129,4	117,2	90,5	100,6	0,0
LN-Werte					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO		
I	3,84	4,00	3,62		
II	5,65	5,60	5,14		
III	2,40	2,01	2,01		
V	3,12	3,10	3,27		
VI	2,60	2,39	2,53		
VIII	2,69	2,98	2,29		
IX	3,03	2,95	2,53		
X	3,94	3,79	3,54		
XI	5,93	5,81	5,64		
XII	4,18	4,05	4,04		
t-Test	B[a]P	Phe			
	0,002	0,045			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	124,9	146,3	100,0	107,0	0,0
II	166,6	158,5	100,0	100,1	0,0
III	147,3	99,5	100,0	147,3	0,0
V	86,6	85,1	100,0	63,0	0,0
VI	108,0	87,2	100,0	80,8	0,0
VIII	149,5	199,0	100,0	96,0	0,0
IX	165,6	153,6	100,0	80,8	0,0
X	148,4	127,8	100,0	105,5	0,0
XI	133,0	117,9	100,0	112,3	0,0
XII	115,1	100,9	100,0	85,7	0,0
Mittelwerte	134,49	127,58	100,00	97,84	0,00
StabW	25,9	36,7	0,0	23,0	0,0

IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit mit 1 µmolar Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon und rBet v 1 (Daten zu Abb.41)

IL-8-Freisetzung in pg/ml						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
III	21,6	15,0	16,4	18,9	11,0	0,00
VIII	20,4	17,1	11,0	15,3	9,5	0,00
IX	21,6	15,5	16,9	14,9	10,1	0,00
X	42,4	31,7	36,1	33,7	36,4	0,00
XI	166,3	255,7	317,4	320,3	317,3	0,00
XII	67,2	73,6	88,2	93,4	48,7	0,00
Mittelwerte	56,58	68,11	81,00	82,75	72,17	0,00
StabW	56,8	94,6	119,3	120,1	121,2	0,0
LN-Werte						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1			
III	3,07	2,71	2,80			
VIII	3,02	2,84	2,40			
IX	3,07	2,74	2,83			
X	3,75	3,46	3,59			
XI	5,11	5,54	5,76			
XII	4,21	4,30	4,48			
t-Test	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1				
	0,7441	0,6796				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
III	131,7	91,5	100,0	115,2	67,1	0,0
VIII	185,2	155,6	100,0	138,9	86,3	0,0
IX	127,8	91,7	100,0	88,2	59,8	0,0
X	177,5	87,8	100,0	93,4	100,8	0,0
XI	52,4	80,6	100,0	100,9	100,0	0,0
XII	76,2	83,4	100,0	105,9	55,2	0,0
Mittelwerte	115,13	98,43	100,00	107,08	78,18	0,00
StabW	46,5	28,3	0,0	18,3	20,2	0,0

**IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren-9,10-Hydrochinon
oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.41)**

IL-8-Freisetzung in pg/ml					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
III	10,1	9,1	7,5	11,0	0,00
VIII	14,8	19,7	9,9	9,5	0,00
IX	22,1	12,1	12,5	10,1	0,00
X	26,2	40,1	34,5	36,4	0,00
XI	165,8	285,0	282,5	317,3	0,00
XII	45,1	43,6	56,8	48,7	0,00
Mittelwerte	47,35	68,27	67,28	72,17	0,00
StabW	59,3	107,1	107,1	121,2	0,0
LN-Werte					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO		
III	2,31	2,21	2,01		
VIII	2,69	2,98	2,29		
IX	3,10	2,49	2,53		
X	3,27	3,69	3,54		
XI	5,11	5,65	5,64		
XII	3,81	3,78	4,04		
t-Test	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,837	0,384			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
III	135,2	121,8	100,0	147,3	0,0
VIII	149,5	199,0	100,0	96,0	0,0
IX	176,8	96,8	100,0	80,8	0,0
X	75,9	116,2	100,0	105,5	0,0
XI	58,7	100,9	100,0	112,3	0,0
XII	79,4	76,8	100,0	85,7	0,0
Mittelwerte	112,59	118,58	100,00	104,60	0,00
StabW	47,6	42,5	0,0	24,0	0,0

Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren oder Benzo[a]pyren und rBet v 1 (Daten zu Abb.36)

Histamin-Freisetzung [nM]						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	1999	1949	2742	2426	797	0
II	2277	2326	1774	1971	1034	0
III	1654	1373	1868	1895	638	0
V	2834	3578	2820	2731	1749	0
VI	1068	2088	1266	1264	1134	0
VIII	1257	1545	1432	1780	799	0
IX	1593	1279	1513	1312	1026	0
X	1439	1309	1710	1707	829	0
XI	1659	1597	2087	2242	565	0
XII	3194	2734	2680	2984	1270	0
Mittelwerte	2007,4	1977,8	1989,2	2031,2	984,1	0,0
StabW	826,9	737,9	571,8	567,1	346,8	0,0
LN-Werte						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1			
I	7,60	7,58	7,92			
II	8,12	7,75	7,48			
III	7,41	7,22	7,53			
V	7,95	8,18	7,94			
VI	6,97	7,64	7,14			
VIII	7,14	7,34	7,27			
IX	7,37	7,15	7,32			
X	7,27	7,18	7,44			
XI	7,41	7,38	7,64			
XII	8,07	7,91	7,89			
t-Test	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1				
	0,786	0,795				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	72,9	71,1	100,0	88,5	32,9	0,0
II	190,4	131,1	100,0	111,1	52,5	0,0
III	88,5	73,5	100,0	101,4	33,7	0,0
V	100,5	126,9	100,0	96,8	64,0	0,0
VI	84,4	164,9	100,0	99,8	89,7	0,0
VIII	87,8	107,9	100,0	124,3	44,9	0,0
IX	105,3	84,5	100,0	86,7	78,2	0,0
X	84,2	76,5	100,0	99,8	46,6	0,0
XI	79,5	76,5	100,0	107,4	25,2	0,0
XII	119,2	102,0	100,0	111,3	42,6	0,0
Mittelwerte	101,26	101,50	100,00	102,73	51,22	0,00
StabW	34,1	31,3	0,0	11,3	20,6	0,0

Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ molar Phenanthren oder Benzo[a]pyren ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.36)

Histamin-Freisetzung [nM]					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	1355	1551	2249	797	0
II	2808	2058	1049	1034	0
III	1629	1534	1237	638	0
V	1943	2272	1830	1749	0
VI	1560	1253	997	1134	0
VIII	876	2913	651	799	0
IX	1171	1025	984	1026	0
X	932	1520	953	829	0
XI	577	1791	947	565	0
XII	1177	1211	1071	1270	0
Mittelwerte	1402,8	1712,8	1196,8	984,1	0,0
StabW	635,1	568,6	477,5	346,8	0,0
LN-Werte					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO		
I	7,21	7,35	7,72		
II	7,94	7,63	6,96		
III	7,40	7,34	7,12		
V	7,57	7,73	7,51		
VI	7,35	7,13	6,90		
VIII	6,78	7,98	6,48		
IX	7,07	6,93	6,89		
X	6,84	7,33	6,86		
XI	6,36	7,49	6,85		
XII	7,07	7,10	6,98		
t-Test	B[a]P	Phe			
	0,367	0,042			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	60,2	69,0	100,0	35,4	0,0
II	267,7	196,2	100,0	98,6	0,0
III	131,7	124,0	100,0	51,6	0,0
V	106,2	124,2	100,0	95,6	0,0
VI	156,5	125,7	100,0	113,7	0,0
VIII	134,6	447,5	100,0	122,7	0,0
IX	119,0	104,2	100,0	104,3	0,0
X	97,8	159,5	100,0	87,0	0,0
XI	60,9	189,1	100,0	57,7	0,0
XII	109,9	113,1	100,0	188,6	0,0
Mittelwerte	124,45	165,23	100,00	88,71	0,00
StabW	58,8	106,4	0,0	30,0	0,0

Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon und rBet v 1 (Daten zu Abb.42)

Histamin-Freisetzung [nM]						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon+rBet v 1	DMSO+rBet v 1	rBet v 1	Medium+Zellen	Medium
II	837	867	891	891	1319	0
III	1433	1739	1868	1895	638	0
V	2872	2626	2820	2731	1749	0
IX	936	1094	1513	1312	1026	0
X	6375	4515	4054	4133	3762	0
XI	1530	1005	2087	2242	565	0
XII	3194	2734	2680	2984	1270	0
Mittelwerte	2453,8	2082,8	2273,3	2312,6	1475,6	0,0
StabW	1954,2	1314,7	1026,6	1091,0	1088,0	0,0
LN-Werte						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon+rBet v 1	DMSO+rBet v 1			
II	6,73	6,77	6,79			
III	7,29	7,46	7,53			
V	7,96	7,87	7,94			
IX	6,84	7,00	7,32			
X	8,76	8,42	8,31			
XI	7,33	6,91	7,64			
XII	8,07	7,91	7,89			
t-Test						
	0,594	0,197				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon+rBet v 1	DMSO+rBet v 1	rBet v 1	Medium+Zellen	Medium
II	93,9	97,3	100,0	100,0	148,0	0,0
III	76,7	93,1	100,0	101,4	33,7	0,0
V	101,9	93,1	100,0	96,8	64,0	0,0
IX	61,8	72,3	100,0	86,8	78,2	0,0
X	157,3	111,4	100,0	101,9	91,0	0,0
XI	73,3	48,2	100,0	107,4	25,2	0,0
XII	119,2	102,0	100,0	111,3	42,6	0,0
Mittelwerte	97,72	88,19	100,00	100,83	68,96	0,00
StabW	32,6	21,3	0,0	7,9	42,2	0,0

Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ molar Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.42)

Histamin-Freisetzung [nM]					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
II	913	1324	917	1319	0
III	1384	1047	1237	638	0
V	2453	1943	1830	1749	0
IX	1117	1289	984	1026	0
X	3695	4498	3274	3762	0
XI	1224	2158	947	565	0
XII	1177	1211	1071	1270	0
Mittelwerte	1709,1	1924,1	1473,4	1475,6	0,0
StabW	1008,8	1205,7	852,1	1088,0	0,0
LN-Werte					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO		
II	6,82	7,19	6,88		
III	7,23	6,95	7,12		
V	7,81	7,57	7,51		
IX	7,02	7,16	6,89		
X	8,21	8,41	8,09		
XI	7,11	7,68	6,85		
XII	7,07	7,10	6,98		
t-Test	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,022	0,076			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
II	94,0	136,4	100,0	135,8	0,0
III	111,9	84,6	100,0	51,6	0,0
V	134,1	106,2	100,0	95,6	0,0
IX	113,5	130,9	100,0	104,3	0,0
X	112,9	137,4	100,0	114,9	0,0
XI	129,3	227,8	100,0	59,7	0,0
XII	109,9	113,1	100,0	118,6	0,0
Mittelwerte	115,07	133,77	100,00	97,20	0,00
StabW	13,2	45,6	0,0	31,1	0,0

Histamin-Freisetzungsfähigkeit (Daten zu Abb.33)

Probe (MW)	Histamin-Freisetzung [nM]
Medium	602
rBet v 1 (0,18 ng/ml)	2130
Gesamthistamin nach Triton X	3506

Dosis-Wirkungsbeziehungen (Daten zu Abb. 38)

Patient II rBet v 1: 1,6 ng/ml	IL-4-Freisetzung [pg/ml]
Benzo[a]pyren 5 µmolar + rBet v 1	5,01
Benzo[a]pyren 1 µmolar + rBet v 1	5,44
Benzo[a]pyren 0,5 µmolar + rBet v 1	4,89
Benzo[a]pyren 0,1 µmolar + rBet v 1	4,90
Phenanthren 5 µmolar + rBet v 1	4,98
Phenanthren 1 µmolar + rBet v 1	5,73
Phenanthren 0,5 µmolar + rBet v 1	4,90
Phenanthren 0,1 µmolar + rBet v 1	4,72
Positivkontrolle	36,99
Negativkontrolle	0,40
	IL-8-Freisetzung [pg/ml]
Benzo[a]pyren 5 µmolar + rBet v 1	57,7
Benzo[a]pyren 1 µmolar + rBet v 1	53,7
Benzo[a]pyren 0,5 µmolar + rBet v 1	54,7
Benzo[a]pyren 0,1 µmolar + rBet v 1	41,9
Benzo[a]pyren 0 µmolar + rBet v 1	45,0
Phenanthren 5 µmolar + rBet v 1	49,4
Phenanthren 1 µmolar + rBet v 1	57,4
Phenanthren 0,5 µmolar + rBet v 1	43,6
Phenanthren 0,1 µmolar + rBet v 1	40,8
Phenanthren 0 µmolar + rBet v 1	45,0
Negativkontrolle	0,0
	Histamin-Freisetzung [nmolar]
Benzo[a]pyren 5 µmolar + rBet v 1	1791
Benzo[a]pyren 1 µmolar + rBet v 1	2027
Benzo[a]pyren 0,5 µmolar + rBet v 1	1714
Benzo[a]pyren 0,1 µmolar + rBet v 1	1736
Benzo[a]pyren 0 µmolar + rBet v 1	1336
Phenanthren 5 µmolar + rBet v 1	2586
Phenanthren 1 µmolar + rBet v 1	2044
Phenanthren 0,5 µmolar + rBet v 1	1692
Phenanthren 0,1 µmolar + rBet v 1	1437
Phenanthren 0 µmolar + rBet v 1	1336
Negativkontrolle	0

**Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren oder
Benzo[a]pyren und rBet v 1 (Daten zu Abb.39)**

Tryptase-Freisetzung [Counts]						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	1596	1446	1536	1819	1073	223
II	1478	1370	1082	1122	633	220
V	2099	2020	1972	2015	796	218
VIII	368	358	337	367	286	213
IX	814	821	787	775	981	249
X	4377	5248	3816	3753	1963	228
XI	534	553	509	581	433	181
XII	375	401	344	362	274	182
Mittelwerte	1455,1	1527,1	1297,9	1349,3	804,9	214,3
StabW	1340,6	1612,5	1172,0	1155,9	555,9	22,9
LN-Werte						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1			
I	7,38	7,28	7,34			
II	7,30	7,22	6,99			
V	7,65	7,61	7,59			
VIII	5,91	5,88	5,82			
IX	6,70	6,71	6,67			
X	8,38	8,57	8,25			
XI	6,28	6,32	6,23			
XII	5,93	5,99	5,84			
t-Test	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1				
	0,0172	0,0428				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	B[a]P + rBet v 1	Phe + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	103,9	94,1	100,0	118,4	69,9	14,5
II	136,6	126,6	100,0	103,7	58,5	20,3
V	106,4	102,4	100,0	102,2	40,4	11,1
VIII	109,2	106,2	100,0	108,9	84,9	63,2
IX	103,4	104,3	100,0	98,5	124,7	31,6
X	114,7	137,5	100,0	98,3	51,4	6,0
XI	104,9	108,6	100,0	114,1	85,1	35,6
XII	109,0	116,6	100,0	105,2	79,7	52,9
Mittelwerte	111,02	112,06	100,00	106,18	74,30	29,40
StabW	11,0	14,1	0,0	7,2	26,0	20

Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren oder Benzo[a]pyren ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.39)

Tryptase-Freisetzung [Counts]					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	587	638	987	1073	223
II	1507	1348	676	633	220
V	885	871	822	796	218
VIII	292	279	294	286	213
IX	552	873	506	981	249
X	3684	2034	3480	1963	228
XI	722	457	447	433	181
XII	247	307	288	274	182
Mittelwerte	1059,5	850,9	937,5	804,9	214,3
StabW	1131,5	594,2	1056,4	555,9	22,9
LN-Werte					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO		
I	6,38	6,46	6,89		
II	7,32	7,21	6,52		
V	6,79	6,77	6,71		
VIII	5,68	5,63	5,68		
IX	6,31	6,77	6,23		
X	8,21	7,62	8,15		
XI	6,58	6,12	6,10		
XII	5,51	5,73	5,66		
t-Test	B[a]P	Phe			
	0,489	0,776			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	B[a]P	Phe	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	59,5	64,6	100,0	108,7	22,6
II	222,9	199,4	100,0	93,6	32,5
V	107,7	106,0	100,0	96,8	26,5
VIII	99,3	94,9	100,0	97,3	72,4
IX	109,1	172,5	100,0	193,9	49,2
X	105,9	58,4	100,0	56,4	6,6
XI	161,5	102,2	100,0	96,9	40,5
XII	85,8	106,6	100,0	95,1	63,2
Mittelwerte	118,95	113,09	100,00	104,84	39,19
StabW	50,8	49,1	0,0	39,1	22,0

Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon und rBet v 1 (Daten zu Abb.43)

Tryptase-Freisetzung [Counts]						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	1211	1375	1536	1819	1073	223
V	1921	1891	1972	2015	796	218
IX	636	721	787	775	981	249
XI	456	779	509	581	433	181
XII	341	397	344	362	274	182
Mittelwerte	913,0	1032,6	1029,6	1110,4	711,4	210,6
StabW	655,3	595,7	697,2	753,9	346,2	29,0
LN-Werte						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1			
I	7,10	7,23	7,34			
V	7,56	7,54	7,59			
IX	6,46	6,58	6,67			
XI	6,12	6,66	6,23			
XII	5,83	5,98	5,84			
t-Test	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1				
	0,0646	0,5486				
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle						
Patient	Phe-HyChinon+rBet v 1	B[a]P-Chinon + rBet v 1	DMSO + rBet v 1	rBet v 1	Medium + Zellen	Medium
I	78,8	89,5	100,0	118,4	69,9	14,5
V	97,4	95,9	100,0	102,2	40,4	11,1
IX	80,8	91,6	100,0	98,5	124,7	31,6
XI	89,6	153,0	100,0	114,5	85,1	35,6
XII	99,1	115,4	100,0	105,2	79,7	52,9
Mittelwerte	89,16	109,10	100,00	107,69	79,92	29,14
StabW	9,3	26,6	0,0	8,3	30,4	17,0

Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon ohne rBet v 1 (Daten zu Abb.43)

Tryptase-Freisetzung [Counts]					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	671	922	987	1073	223
V	894	958	822	796	218
IX	799	506	506	981	249
XI	429	419	447	433	181
XII	251	302	288	274	182
Mittelwerte	608,8	621,4	610,0	711,4	210,6
StabW	265,4	300,0	286,4	346,2	29,0
LN-Werte					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO		
I	6,51	6,83	6,89		
V	6,80	6,86	6,71		
IX	6,68	6,23	6,23		
XI	6,06	6,04	6,10		
XII	5,53	5,71	5,66		
t-Test	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,974	0,758			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle					
Patient	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
I	68,0	93,4	100,0	108,7	22,6
V	108,8	116,5	100,0	96,8	26,5
IX	157,9	100,0	100,0	193,9	49,2
XI	96,0	93,7	100,0	96,9	40,5
XII	87,2	104,9	100,0	95,1	63,2
Mittelwerte	103,55	101,71	100,00	118,29	40,40
StabW	33,8	9,6	0,0	42,6	16,6

ELISA-Ergebnisse: nichtallergische Kontrollen (Daten zu Abb.44)

IL-4-Freisetzung nach Inkubation mit 1 μ molar Phenanthren, Benzo[a]pyren, Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon ohne rBet v 1

IL-4-Freisetzung [pg/ml]							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	1,6	1,7	1,4	1,5	1,5	1,5	0,0
2	1,3	1,3	2	2,1	1,5	1,4	0,0
3	2,6	3,0	2,4	2,6	2,9	3,3	0,0
4	1,1	1,1	1,2	1,1	1,0	1,0	0,0
5	1,6	1,6	1,8	1,5	1,6	1,6	0,0
Mittelwerte	1,64	1,71	1,76	1,75	1,69	1,75	0,00
StabW	0,6	0,7	0,5	0,6	0,7	0,9	0,0
LN-Werte							
Kontrolle							
1	0,45	0,51	0,36	0,39	0,43		
2	0,29	0,25	0,69	0,73	0,39		
3	0,97	1,09	0,88	0,96	1,07		
4	0,05	0,05	0,19	0,09	-0,03		
5	0,48	0,45	0,57	0,41	0,44		
t-Test	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,796	0,805	0,449	0,529			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	101,9	107,8	92,9	96,1	100,0	98,7	0,0
2	91,2	87,8	136,1	141,5	100,0	92,5	0,0
3	90,4	101,4	82,2	89,0	100,0	113,0	0,0
4	108,2	108,2	124,7	112,4	100,0	102,1	0,0
5	104,5	101,3	114,2	97,4	100,0	101,9	0,0
Mittelwerte	99,26	101,29	110,01	107,29	100,00	101,65	0,00
StabW	8,1	8,3	22,3	20,9	0,0	7,4	0,0

IL-8-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren , Benzo[a]pyren, Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon ohne rBet v 1

IL-8-Freisetzung [pg/ml]							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	8,7	7,0	8,4	7,4	7,2	5,5	0,0
2	3,5	3,4	3,7	2,8	3,1	3,2	0,0
3	19,4	18,6	16,5	17,1	18,1	17,7	0,0
4	8,6	8,3	6,6	5,7	7,1	8,1	0,0
5	7,6	8,4	6,8	6,0	9,4	7,2	0,0
Mittelwerte	9,56	9,14	8,40	7,80	8,98	8,34	0,00
StabW	5,9	5,7	4,8	5,5	5,6	5,6	0,0
LN-Werte							
Kontrolle							
1	2,16	1,95	2,13	2,00			
2	1,25	1,22	1,31	1,03			
3	2,97	2,92	2,80	2,84			
4	2,15	2,12	1,89	1,74			
5	2,03	2,13	1,92	1,79			
t-Test	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,391	0,593	0,748	0,125			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	120,8	97,2	116,7	102,8	100,0	76,4	0,0
2	112,9	109,7	119,4	90,3	100,0	103,2	0,0
3	107,2	102,8	91,2	94,5	100,0	97,8	0,0
4	121,1	116,9	93,0	80,3	100,0	114,1	0,0
5	80,9	89,4	72,3	63,8	100,0	76,7	0,0
Mittelwerte	108,58	103,19	98,50	86,34	100,00	93,62	0,00
StabW	16,6	10,7	19,6	15,0	0,0	16,7	0,0

**Histamin-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren ,
Benzo[a]pyren, Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon
ohne rBet v 1**

Histamin-Freisetzung [nM]							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	1034	1342	2436	1065	2339	1880	0,0
2	6538	4637	5326	3068	5783	3673	0,0
3	907	1506	1330	997	1457	1491	0,0
4	1943	2272	1070	2097	1830	1749	0,0
5	116	163	358	416	187	335	0,0
Mittelwerte	2107,6	1984,0	2104,0	1528,6	2334,8	1765,6	0,00
StabW	2560,1	1664,2	1949,9	1052,2	2091,7	1203,6	0,0
LN-Werte							
Kontrolle							
1	6,94	7,20	7,80	6,97			
2	8,79	8,44	8,58	8,03			
3	6,81	7,32	7,19	6,90			
4	7,57	7,73	6,98	7,65			
5	4,75	5,09	5,88	6,03			
t-Test	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,150	0,351	0,955	0,571			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	43,1	55,9	101,5	44,4	100,0	65,9	0,0
2	113,1	80,2	92,1	53,1	100,0	63,5	0,0
3	61,5	102,1	90,2	67,6	100,0	101,1	0,0
4	106,2	124,2	58,5	114,6	100,0	95,6	0,0
5	62,0	87,2	191,4	222,5	100,0	179,1	0,0
Mittelwerte	77,17	89,91	106,74	100,42	100,00	101,04	0,00
StabW	30,7	25,4	50,1	73,4	0,0	46,8	0,0

**Tryptase-Freisetzung nach Inkubation mit 1 µmolar Phenanthren ,
Benzo[a]pyren, Phenanthren-9,10-Hydrochinon oder 1,6-Benzo[a]pyren-Chinon
ohne rBet v 1**

Tryptase-Freisetzung [Counts]							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	1081	1132	1137	1150	1164	1083	200
2	1040	1037	1062	1036	1071	1118	214
4	205	223	214	216	214	225	200
5	835	942	828	850	898		241
Mittelwerte	790,25	833,50	810,25	813,00	836,75	808,67	213,75
StabW	404,7	414,3	418,7	416,8	429,5	505,8	19,3
LN-Werte							
Kontrolle							
1	6,99	7,03	7,04	7,05			
2	6,95	6,94	6,97	6,94			
4	5,32	5,41	5,37	5,38			
5	6,73	6,85	6,72	6,75			
t-Test	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon			
	0,016	0,760	0,220	0,198			
Änderung in % zur DMSO-Kontrolle							
Kontrolle	B[a]P	Phe	Phe-HyChinon	B[a]P-Chinon	DMSO	Medium + Zellen	Medium
1	92,9	97,3	97,7	98,8	100,0	93,0	17,2
2	97,1	96,8	99,2	96,7	100,0	104,4	20,0
4	95,8	104,2	100,0	100,9	100,0	105,1	93,5
5	93,0	104,9	92,2	94,7	100,0		26,8
Mittelwerte	94,69	100,80	97,26	97,78	100,00	100,86	39,36
StabW	2,1	4,4	3,5	2,7	0,0	6,8	36

Migrationsassay (Daten zu Abb.45)

IL-8 [ng/ml]	Zellzahl Probandin I	Zellzahl Proband II	Migrationsindex Probandin I	<i>Migrationsindex Proband II</i>
1000	12111	6351	3,52	6,53
500	10209	6893	2,97	7,09
100	12973	7046	3,77	7,25
10	10811	7114	3,14	7,32
1	8776	5284	2,55	5,44
0,1	3740	1677	1,09	1,73
0,01	3144	1035	0,91	1,06
0,001	2714	1390	0,79	1,43
0,0001	3173	1236	0,92	1,27
Positivkontrolle (LTB ₄)	12940	7622	3,76	7,84
Negativkontrolle (Medium)	3442	972	1,00	1,00