

# Einfluss von Ozon auf den Allergengehalt von Graspollen

Von der Fakultät für Naturwissenschaften  
der Universität Paderborn  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
**Dr. rer. nat.**

genehmigte Dissertation

von  
**Kristin Galler**  
aus  
Bad Driburg

Paderborn, Mai 2003

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis Mai 2003 im Fachgebiet Technische Chemie und Chemische Verfahrenstechnik der Universität Paderborn angefertigt.

Referent: Prof. Dr. H.-J. Warnecke  
Korreferent: Prof. Dr. H. Paradies

Tag der Abgabe: 30. 5.2003  
Tag der mündlichen Prüfung: 27.6.2003

Herrn Prof. Dr. H.-J. Warnecke danke ich für die interessante, fachübergreifende Themenstellung und die gewährten Freiräume bei der Bearbeitung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Paradies danke ich für die Übernahme des Korreferates, die Beratung bei biochemischen Fragestellungen und die vielen guten Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Weiß und allen Mitarbeitern des sportmedizinischen Institutes, vor allem Dr. Ulrich Deppe, Dr. Maya Vangala, Barbara Götte und Michaela Langrock für die Nutzung des Labors und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Dr. Peter Dapprich und Anke Holtzmann, FH Soest, FB Agrarwirtschaft danke ich für die Nutzung des Gewächshauses, Betreuung der Pflanzen und Rat bei allen Grasproblemen.

Der DSV, besonders Herrn Dr. Feuerstein, Herrn Dr. Bothe und Herrn Dr. Eickmeyer danke ich für Bereitstellung von Pflanzen und Saatgut und das Interesse an meiner Arbeit.

Dem Landesumweltamt in Essen-Kettwich danke ich für Nutzung der Begasungskammern und die Betreuung der Pflanzen.

Frau D. Comisel danke ich für jahrelange gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, Erfahrungen zu sammeln, die ich nicht missen möchte.

Für Hilfe bei allen biologischen Fragen, schweren Kisten und Korrekturlesen möchte ich Dr. Jörg-Thomas Franz danken.

Für die Lösung von Tex-Problemen, Tee, Kekse und viel Spaß während der letzten Jahre danke ich meinen Bürokollegen Hermann-Josef Post und Oliver Smits sowie Joachim Kleine und Petra Müller. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen.

Mein Dank gilt allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Sie trugen durch ein angenehmes Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung, meinen Schwestern, die mich immer auf andere Gedanken bringen konnten, und Wolfgang.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1	Immunsystem und Allergien . . . . .	3
2.1.1	Das menschliche Immunsystem . . . . .	3
2.1.2	Antikörper und ihre Bindungseigenschaften . . . . .	4
2.1.3	Allergien . . . . .	6
2.1.4	Allergene und ihre Nomenklatur . . . . .	8
2.1.5	Pollen . . . . .	10
2.1.6	Allergene des Weidelgrases . . . . .	12
2.2	Erhöhte Ozonwerte und ihre Auswirkungen auf Pflanzen . . . . .	16
2.2.1	Erhöhte Ozonwerte . . . . .	16
2.2.2	Auftreten von erhöhten Ozonwerten . . . . .	17
2.2.3	Auswirkungen von erhöhten Ozonwerten auf Pflanzen . . . . .	18
2.2.4	Ozonschäden an Weidelgras . . . . .	20
2.2.5	Pollen und Luftschadstoffe . . . . .	21
2.2.6	Ozonschäden an Weidelgraspollen . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1	Ozonisierungskammern und Pflanzenmaterial . . . . .	24
3.1.1	Begasungskammern LUA Essen . . . . .	24
3.1.2	Begasungskammern Paderborn . . . . .	25
3.2	Biochemische Analytik . . . . .	30
3.2.1	ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) . . . . .	30
3.2.2	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes . . . . .	31
3.2.3	Elektrophorese . . . . .	32
3.2.4	Kapillarelektrophorese . . . . .	33
3.2.5	Proteinfärbung in Gelen . . . . .	36
3.2.6	Blotting . . . . .	37
3.2.7	FTIR-Spektroskopie . . . . .	38
3.2.8	Extraktion . . . . .	41
3.3	Pflanzenmaterial . . . . .	42

<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>44</b>
4.1	Protein- und Allergengehalt . . . . .	44
4.1.1	Klimakammern Paderborn . . . . .	44
4.1.2	Klimakammern Essen . . . . .	47
4.1.3	Fazit . . . . .	47
4.2	SDS-Gelelektrophorese und Blots . . . . .	50
4.2.1	Nachweis der Allergene im Gel . . . . .	50
4.2.2	Vergleich ozonisierte und Kontrolleextrakte . . . . .	51
4.3	Kapillarelektrophorese . . . . .	54
4.3.1	Methodenentwicklung . . . . .	54
4.3.2	Versuche zur Identifizierung von Allergenen im Elektropherogramm . . . . .	55
4.3.3	Vergleich von ozonisierten und Kontrolleextrakten . . . . .	57
4.3.4	Fazit . . . . .	60
4.4	FTIR . . . . .	61
4.4.1	Spektren . . . . .	61
4.4.2	Vergleich begaste - unbegaste Probe . . . . .	62
4.4.3	Fazit . . . . .	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>67</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>B</b>	<b>Begasungsversuche und Pflanzen</b>	<b>71</b>
B.0.4	<i>Lolium multiflorum</i> . . . . .	71
B.0.5	<i>Lolium perenne</i> . . . . .	71
B.0.6	<i>Lolium westerwoldicum</i> . . . . .	71
B.0.7	Verwendete Materialien . . . . .	72
B.0.8	Lampen in den Klimakammern . . . . .	72
B.0.9	Kalibrierung der Feuchtesensoren . . . . .	73
<b>C</b>	<b>Versuchsdurchführungen</b>	<b>74</b>
C.1	Extraktion der Pollen . . . . .	74
C.2	Proteingehaltsbestimmung (Lowry-Test) . . . . .	74
C.3	ELISA . . . . .	75
C.4	Denaturierende, nicht reduzierende SDS-Gelelektrophorese . . . . .	76
C.4.1	Puffer . . . . .	76
C.4.2	Gießen des Gels . . . . .	76
C.4.3	Vorbereitung der Proben . . . . .	77
C.4.4	Durchführung der Elektrophorese . . . . .	77
C.5	Kolloidale Coomassiefärbung . . . . .	77
C.6	Westernblot im Anschluss an die Gelelektrophorese . . . . .	78
C.6.1	Semidry . . . . .	78

C.6.2 Kapillarblot . . . . .	79
C.7 Immunchemische Detektion . . . . .	80
C.8 Kapillarelektrophorese . . . . .	81
C.9 FTIR . . . . .	81
C.10 Chemikalien und Reagenzien . . . . .	82
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>

# Kapitel 1

## Einleitung und Aufgabenstellung

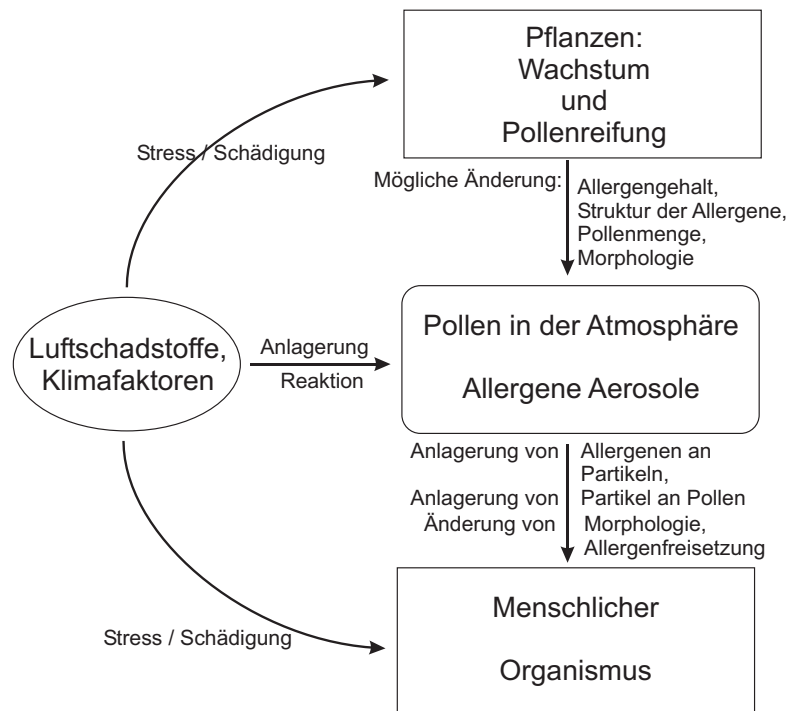
Allergien zählen in den Industrieländern zu den häufigsten Krankheiten. Hauptauslöser sind neben Milben (ganzjährig) vor allem Pollen von Gräsern und Bäumen (saisonale Allergie). Nach Schätzungen des Ärzteverbandes deutscher Allergologen [1] leiden ca. 12 Millionen Deutsche an einer Pollenallergie. Bei etwa 40 % der Betroffenen entsteht daraus ein Bronchialasthma.

In den letzten Jahrzehnten beobachtet man einen Anstieg der Allergiehäufigkeit, was auf verschiedene Ursachen zurückgeführt wird. Zum einen führen veränderte Lebensbedingungen wie mehr Hygiene, weniger Kinderkrankheiten und Parasiten dazu, dass das Immunsystem weniger gefordert ist. Es kann dann, vor allem bei genetisch dafür veranlagten Menschen, auf eigentlich harmlose Stoffe mit einer Allergie reagieren.

Zum anderen können auch Umweltschadstoffe wie Stickoxide, Ozon oder Rußpartikel zu Reizungen der Atemwege und damit zu erhöhter Anfälligkeit führen. Luftschadstoffe „alten Typs“ ( $\text{SO}_2$ , Rußpartikel) der sogenannten Klasse I führen u.a. zu Bronchialerkrankungen. Typisches Beispiel hierfür war die DDR. Bronchitis war dort die Hauptatemwegserkrankung, Allergien waren weit weniger verbreitet als in Westdeutschland, wo Luftverschmutzung vom Typ II ( $\text{NO}_x$ , Photooxidantien wie Ozon) vorherrschte. In den Jahren nach der Wiedervereinigung glichen sich sowohl Luftverschmutzung als auch Allergiehäufigkeit in Ostdeutschland den Werten der westlichen Länder an [2]. Auswirkungen von Photooxidantien sind dabei hauptsächlich auf Ozon zurückzuführen. Es ist nachgewiesen, dass Ozon die Lungenfunktion und die Atemwege negativ beeinflusst [3]. Es kann bei bereits sensibilisierten Individuen die Wirkung von Allergenen verstärken, eine erhöhte Sensibilisierungsrate unter Ozoneinfluss konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Pollen kommen, während sie vom Wind transportiert werden, mit Luftschadstoffen in Berührung. An ihrer Oberfläche können sich Partikel anlagern, die dann gemeinsam mit dem Pollen in die Atemwege gelangen. Gleichzeitig können





**Abbildung 1.1:** Auswirkungen von Schadstoffen auf Mensch und Pflanze

sich durch Feuchtigkeit freigesetzte Allergene an den Partikeln anlagern. Kontakt mit Schadgasen kann zu Veränderungen der Pollenoberfläche und damit der Allergenfreisetzung führen [4].

Umweltverschmutzung schädigt neben dem Menschen auch Fauna und Flora. Während des Wachstums und der Blühperiode der meisten Pflanzen im Sommer treten erhöhte Ozonwerte auf, die für die Pflanzen oxidativen Stress bedeuten und zu Änderungen in ihrem Stoffwechsel führen können. Das kann vermehrte Bildung von Hormonen oder „Stressproteinen“ verursachen. In Versuchen an Birken [5] wurde eine Ähnlichkeit des Majorallergens Bet v 1 mit Stressproteinen von Bohne und Petersilie festgestellt. Dies ist ein Hinweis auf eine verstärkte Expression dieser allergenen Proteine unter Stress. Diese Reaktionen der Pflanze verbrauchen Energie, so dass weniger für den Aufbau von Biomasse oder Pollen zur Verfügung steht. Können die Abwehrmechanismen den oxidativen Stress nicht mehr kompensieren, treten Schäden an den Pflanzen auf, die Auswirkungen auf Pollenmenge und Einlagerung von Allergenen haben können.

Masuch et al. [6] und Hayek et al. [7] konnten erste Beweise für das Auftreten von erhöhtem Allergengehalt in Gras- bzw. Getreidepollen unter Ozoneinfluss anführen. Die vorliegende Arbeit soll diese Ergebnisse absichern und zur weiteren Klärung des Einflusses von Ozonbelastung auf den Allergengehalt von Pollen beitragen.

# Kapitel 2

## Theoretische Grundlagen

### 2.1 Immunsystem und Allergien

#### 2.1.1 Das menschliche Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems umfasst den Schutz des Körpers vor Viren, Bakterien und sonstigen Fremdkörpern. Toleranz gegen körpereigene Stoffe ist dabei besonders wichtig. Fehlt sie, kommt es zu Autoimmunerkrankungen wie multibler Sklerose oder rheumatischer Arthritis. Reagiert das Immunsystem auf eigentlich ungefährliche Stoffe, entstehen Allergien.

Die wichtigsten Zellen für das Immunsystem sind die Lymphozyten, eine Gruppe weißer Blutkörperchen. Sie gliedern sich in B-Lymphozyten, auch B-Zellen genannt, die im Knochenmark heranreifen, und T-Lymphozyten, die im Thymus reifen. B-Zellen produzieren die Antikörper oder Immunglobuline wie IgM, IgG und IgE. Die Antikörper sind dann auf der Oberfläche der B-Zellen gebunden oder zirkulieren frei in der Blutbahn. Jeder Antikörper bindet spezifisch an Strukturen (Epitope) auf einem bestimmtem Antigen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.

Um mit der riesigen Menge von verschiedenen Fremdstoffen, die der Körper abwehren muss, fertig werden zu können, müssen auch große Variationsmöglichkeiten für die Antikörper gegeben sein. Dazu arbeiten die B-Zellen mit Rekombination und Mutation der Antikörpergene und können so über eine Million Antikörpervariationen produzieren. Im reifen Zustand entsteht in jeder B-Zelle nur ein Antikörpertyp, der auf der Zelloberfläche sitzt. Trifft ein passendes Antigen auf die Zelle und wird vom Antikörper gebunden, wird die Zelle aktiv, teilt sich und produziert bis zu 20 Millionen Antikörper pro Stunde. Die Antikörper neutralisieren zum Beispiel Viren im Blut, indem sie sich an sie binden, die Andockstellen an gesunde Zellen blockieren und so die Infizierung von weiteren Zellen verhindern.

Ein wichtiger Faktor des Immunsystems, an dem die Antikörper beteiligt sind, ist das Komplementsystem. Binden Antikörper an Zellen oder an Bakterien,

werden Enzymen im Blut aktiv, die sogenannten Komplementfaktoren. Sie binden an die Antikörper, erkennen so die Bakterien bzw. Zellen und töten sie, indem sie die Zellmembran durchlöchern. Die Makrophagen (Fresszellen) haben ein ähnliches Erkennungssystem und töten markierte Zellen [8].

### 2.1.1.1 Die zelluläre Immunantwort

Die zelluläre Immunantwort ist gegen Viren und Mikroben gerichtet, die Zellen infiziert haben und sich in ihnen „verstecken“. Es gibt einen Mechanismus, der im ersten Schritt infizierte Zellen identifiziert und im zweiten Schritt Abwehrzellen dagegen mobilisiert. Wichtig sind hierbei die von fast allen Zellen produzierten MHC-Moleküle (Major histocompatibility complex). Klasse-1-MHC kommen in allen Körperzellen vor, MHC der Klasse 2 nur in Zellen des Immunsystems. Sie transportieren Peptide von infektiösen Erregern aus der Zelle an die Zelloberfläche. Diese Komplexe werden von T-Lymphozyten erkannt. Virusinfizierte Zellen präsentieren virale Proteinfragmente zusammen mit MHC-1 auf ihrer Oberfläche. Eine Unterart der T-Zelle, der T8-Lymphozyt oder die Zytotoxische Zelle mit dem passenden Rezeptor tötet die infizierte Zelle ab, so dass sie keine weiteren Viren produzieren kann. T4-Zellen erkennen Proteinfragmente zusammen mit MHC-2 Molekülen. Sie rufen Entzündungen hervor und stimulieren die Makrophagen zur Selbstverteidigung.

Eine weitere Untergruppe von T4-Zellen, die T-Helferzellen, steuern die B-Lymphozyten. Bindet ein Fremdmolekül an die oberflächengebundenen Antikörper auf einer B-Zelle, wird es ins Zellinnere transportiert, zerlegt und von MHC-2 auf der Zellmembran präsentiert. Die T4-Helferzelle bindet an diesen Komplex und signalisiert der B-Zelle durch Botenstoffe, dass sie sich stark vermehren und Antikörper ins Blut ausschütten soll.

Insgesamt ist bis jetzt aber erst ein Teil des komplizierten Zusammenspiels der Zellen des Immunsystems verstanden [9].

### 2.1.2 Antikörper und ihre Bindungseigenschaften

Es gibt beim Menschen fünf Antikörpertypen, Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin E (IgE), Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM). Sie bestehen alle aus einer variablen Region, die für die Bindung der verschiedenen Antigene zuständig ist und einer konstanten Region, die den Wirkungs- oder Effektoormechanismus, zum Beispiel die Bindung an eine Zelle, ermöglicht. Die Grundeinheiten der Immunglobuline bilden zwei schwere Ketten, (Index H, heavy chain) mit Molmassen von je 50 kD und zwei leichte Ketten (Index L, light chain) mit Molmassen von je 25 kD. Sie sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Inzwischen sind viele Aminosäuresequenzen der Ketten bekannt. Jede besteht aus Untereinheiten von 110 Aminosäuren, die

leichten Ketten enthalten davon 2, die schweren 4 ( $C_{x1}$ - $C_{x4}$ ). Das x steht hier als Abkürzung für den Antikörpertyp, z.B.  $\epsilon$  für IgE oder  $\mu$  für IgM.

Die aminoterminalen Sequenzen der Antikörper unterscheiden sich stark voneinander. In dieser variablen Region liegen die Antigenbindungsstellen, die Paratope. Die c-terminalen Untereinheiten sind bezüglich der Zusammensetzung fast konstant. Hier sind auch Kohlenhydratketten angelagert.

Die verschiedenen Antikörpertypen unterscheiden sich in der konstanten Region. Bei IgE und IgM gibt es zum Beispiel keine Gelenkregion, dafür eine zusätzliche Domäne im konstanten Bereich. Auch die Kohlenhydratgruppen sind unterschiedlich angeordnet. IgM und IgA können Polymere bilden, IgM vorwiegend Pentamere, IgM Dimere. Dadurch bindet IgM besser an sich wiederholende Epitope wie bakterielle Zellwandpolymere, bei IgA scheint Dimerisierung den Übergang durch die Epithelien zu erleichtern. IgA ist wichtig für die Immunität der Mukosa, IgM und IgG können das Komplementsystem aktivieren. Die Funktion des IgD ist noch unbekannt. IgE scheint für die Abwehr von Parasiten von Bedeutung zu sein.

Allergien vom Soforttyp laufen über das IgE ab. Es wurde erst 1967 von Johansson [10] und Ishizaka [11] entdeckt, da es nur in einer Konzentration von 17-450 ng/ml im Serum enthalten ist.

### 2.1.2.1 Epitope

Die Bindung zwischen Paratop und Epitop beruht auf verschiedenen Prinzipien:

- Wasserstoffbrückenbindungen,
- Ionenbindung,
- van der Waals Kräfte
- und hydrophobe Wechselwirkungen [12].

Die Affinität der Bindung kann sehr unterschiedlich sein. Homologe Antigen-Antikörper-Komplexe mit artspezifischen Antikörpern binden am stärksten. Heterogene Komplexe mit kreuzreaktiven Antigenen zeigen eine geringere Passgenauigkeit, da sie mit dem spezifischen Antigen nur verwandt und nicht chemisch identisch sind.

Man unterscheidet sequenzielle (oder kontinuierliche) Epitope, die aus 5-8 Aminosäuren, die unmittelbar nacheinander auf dem Peptidstrang liegen, und konformationsbedingte, diskontinuierliche Epitope, die durch die Faltungen der dreidimensionalen Struktur der Proteine zustandekommen.

Die Spezifität einer Antigen-Antikörperbindung ist abhängig von der Bindungsstärke (Avidität) und setzt sich zusammen aus:

1. der Affinität, der monovalenten Bindungsstärke zwischen Paratop und Epitop, die über die Gleichgewichtskonstante bestimmt wird,

2. der Multivalenz eines Antikörpers und
3. der Fc-Assoziation von unterschiedlichen Ig-Molekülen zur Antikörperbindung.

Die Avidität ist ein eher funktioneller Begriff, der nur über die Geschwindigkeit der Antigen-Antikörperreaktion zu bestimmen ist.

### 2.1.2.2 Proteine

Proteine sind hochmolekulare Naturstoffe, die aus den 20 natürlich vorkommenden L-Aminosäuren aufgebaut sind. Die Sequenz der Aminosäuren wird als Primärstruktur bezeichnet und ist genetisch vorgegeben. Bei der ribosomalen Proteinbiosynthese wird nach den Informationen, die in der DNA codiert sind, diese Sequenz aufgebaut. Anschließend sind posttranslative Modifikationen wie Glykosylierung möglich. Das Ende der Aminosäurekette, das die freie  $\alpha$ -Aminogruppe trägt, wird als N-Terminus bezeichnet, der C-Terminus hat die Carbonsäurefunktion.

Wichtig für die physiologischen und chemischen Eigenschaften der Proteine ist ihre dreidimensionale Struktur. Als Sekundär- und Tertiärstruktur bezeichnet man periodisch wiederkehrende Faltungen wie die  $\alpha$ -Helix oder das  $\beta$ -Faltblatt, die durch Wasserstoffbrücken stabilisiert sind. Besteht ein Protein aus mehreren Peptidsträngen (Untereinheiten), bezeichnet man das als Quartärstruktur. Sie wird durch Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten, Wasserstoffbrücken, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureseitenketten stabilisiert.

Die Struktur der Proteine ist empfindlich gegen Änderungen von z.B. Temperatur, UV-Strahlung, pH-Änderung und Veränderungen im Salzgehalt [13]. Dadurch kann es zu einer reversiblen (Um-)faltung mit Verlust der biologischen Aktivität kommen (Ausfällung durch organische Lösemittel, Aussalzen). Es kann auch zur irreversiblen Denaturierung der Proteine, z.B. durch Wärme kommen [14]. Da Proteine sowohl saure als auch basische Gruppen im selben Molekül enthalten, haben sie amphotere Eigenschaften. Der pH-Wert, bei dem ihre Ladung neutral ist, wird als isoelektrischer Punkt (pI) bezeichnet.

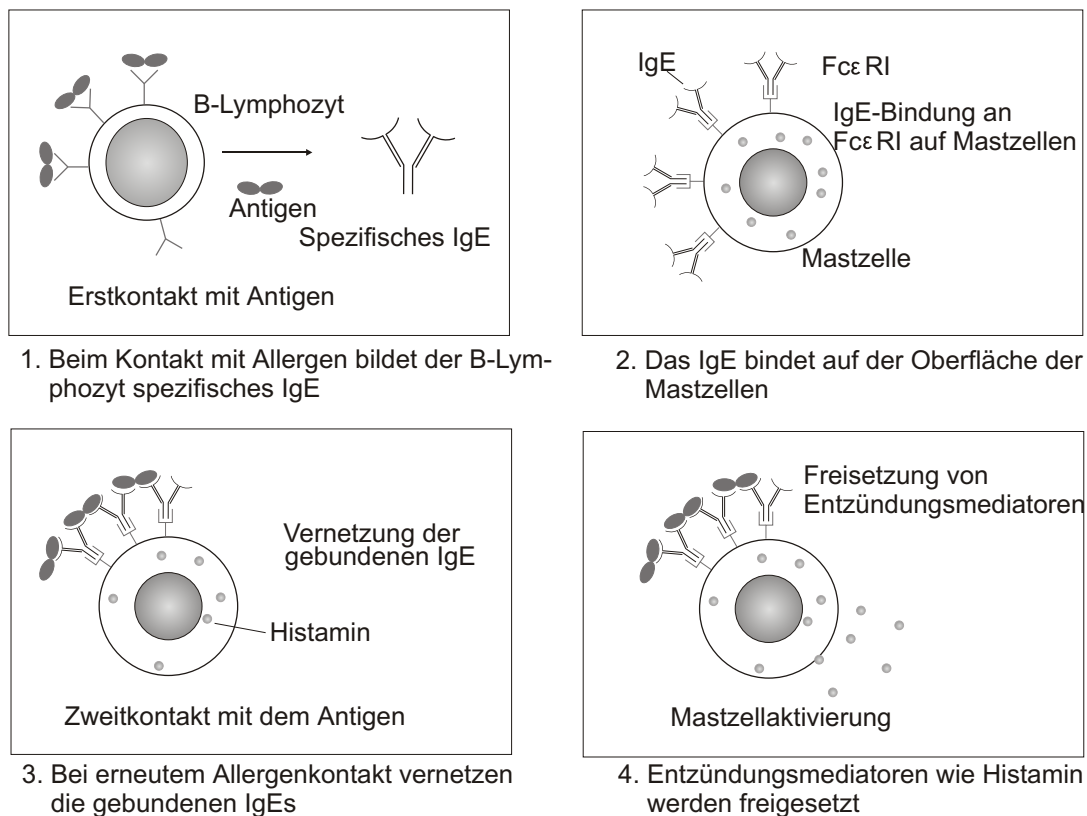
Proteine erfüllen zahlreichen Aufgaben im Organismus. Es gibt Enzyme, Transportproteine, Nährstoff- und Speicherproteine, Strukturproteine und Abwehrstoffe wie die Immunglobuline. Sie können mit verschiedenen chemischen Komponenten konjugiert sein, wie Lipiden (Lipoproteine), Zuckergruppen (Glykoproteine), Metallatomen (Metalloproteine) oder Mineralsäuren [12].

### 2.1.3 Allergien

Als Allergie [8, 15] bezeichnet man eine Überreaktion des Immunsystems auf einen im Prinzip harmlosen Stoff. Schnell nach Kontakt mit einem al-

lergieauslösenden Stoff (Allergen) auftretende Reaktionen, Reaktionen des Soforttyps, werden vom IgE vermittelt. Sie führen durch Mastzellaktivierung zu den typischen Entzündungsreaktionen.

Der typische Ablauf ist folgender: Nach Erstkontakt mit dem Allergen werden die Fremdmoleküle von Makrophagen aufgenommen und auf ihrer Oberfläche präsentiert. Eine Gruppe von T-Helferzellen erkennt diese Komplexe und schüttet Botenstoffe wie z.B. Interleukin 4 aus, die benachbarte B-Zellen, die das Antigen auch erkannt haben, zur Produktion von spezifischen IgE-Molekülen anregen. Diese binden an den Oberflächen von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Diese Sensibilisierungsphase dauert oft mehrere Jahre, und es erfolgt immer wieder Kontakt mit dem Antigen, ohne dass eine Erkrankung sichtbar wird.



**Abbildung 2.1:** Mechanismus der Typ 1 Allergie

Das passiert erst, wenn ein ausreichend hoher IgE-Spiegel erreicht ist. Bei erneutem Allergenkontakt reagiert das Allergen mit dem zellgebundenen IgE, das vernetzt und die Mastzellen zur Ausschüttung von Histamin anregt. Dieser Entzündungsmediator löst Symptome wie Schnupfen, Asthma und tränende Augen aus. Die Art der Symptome hängt von der Art der Antigenaufnahme ab. Bei

intravenöser Aufnahme (Medizin, Serum, Gifte) kann es zu systemischer Anaphylaxie kommen, bei subkutanem Eintritt (Allergietest, Insektenstiche) zu Quaddelbildung, bei oraler Aufnahme (Nahrungsmittelallergie) zu Erbrechen, Durchfall und Urtikaria und bei inhalativer Aufnahme (Pollen, Milbenallergie) zu Heuschnupfen bis hin zu Asthma bronchiale.

Nicht alle Individuen reagieren auf Allergenkontakt mit einer allergischen Reaktion. Voraussetzung hierfür ist zum einen eine genetische Disposition. Den Allergikern gemeinsam ist ein erhöhter IgE-Spiegel, der genau wie die Fähigkeit zur Bildung von Antikörpern gegen Antigene aus speziellen Pflanzengattungen wie z.B. Pollen von *Ambrosia* vererbt wird. Normalerweise beträgt der Gehalt an IgE im Blut 1 mg/ml, bei schwerer Atopie (oder bei Wurminfektionen) kann er bis auf 1000 mg/ml ansteigen. Atopiker produzieren nach Allergenkontakt IgE; während bei „gesunden“ Individuen IgM, IgG und nur Spuren von IgE gebildet werden. Sie zeigen eine höhere Anzahl von Fcε-Rezeptoren und davon ist eine grössere Zahl mit IgE belegt als bei Nichtatopikern.

### 2.1.4 Allergene und ihre Nomenklatur

Allergien werden hauptsächlich von Proteinen und Polypeptiden verursacht, obwohl auch Glyco- und Lipoproteine und Polysaccharide als Allergene agieren können. Dabei reagieren Atopiker nur auf wenige der tausend Proteine, die sie täglich aufnehmen. Was ein potentes Allergen auszeichnet, ist noch nicht geklärt, es gibt aber Voraussetzungen, die für alle allergieauslösenden Stoffe gelten.

Nur Proteine lösen eine T-Zellantwort aus, deshalb muss eine Eiweißkomponente vorhanden sein. Die Allergene diffundieren in die Schleimhaut des Menschen, sie sollten also leicht wasserlöslich sein und ein nicht zu hohes Molekulargewicht (ca. 5000-100000 Da) haben. Aminosäuren und kleinere Peptide sind normalerweise nicht immunogen. Zudem wirken nur Moleküle mit einer gewissen Komplexität als Allergene. Polymerisierte Monoaminosäuren sind nicht allergen. Statistisch gesehen weisen solche Epitope einen hohen „Antigenindex“ auf, die eher hydrophile Aminosäuren enthalten, an der Oberfläche liegen und sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzen. Sie zeigen wenig  $\beta$ -Faltblattstrukturen und enthalten gehäuft L-Prolin und L-Glycin [16].

Allergene treffen nur in geringen Dosen auf unser Immunsystem. Bei Pollen wurden wenige  $\mu\text{g}$  pro Tag berechnet, das sind 0,06  $\mu\text{g}$  allergenes Protein pro Jahr. Diese geringe Konzentration begünstigt die Aktivierung von Il-4 (Interleukin 4) produzierenden CD4-T-Helferzellen.

Einige gut charakterisierte Allergene zeigen Proteaseaktivität. Das kann dazu beitragen, dass sie in die Schleimhaut eindringen und CD4-T-Helferzellen aktivieren. Einige Proteine werden physiologisch von Adjuvantien begleitet, die die IgE-Synthese begünstigen. Eine große evolutionäre Distanz und damit chemische Differenz zwischen antigen- und antikörperbildendem Individuum scheint ein weiterer begünstigender Faktor bei Ausbildung von Allergien zu sein. Um

die Vernetzung von IgE zu verursachen, benötigt ein Protein zwei (verschiedene) IgE-bindende Epitope [17].

Die Allergenität eines Proteins ist noch schwierig vorherzusagen. Die Analyse von vierzig Allergenen mit bekannter Struktur zeigt, dass sie fast alle vier Strukturfamilien zugeordnet werden können.

1. Antiparallele  $\beta$ -Stränge: die immunglobulinähnlich-gefaltete Familie, z.B. Gras Gruppe 2, Milbe Gruppe 2, Serin Proteasen wie Milbe Gruppe 3, 6 und 9 und Soybean-type Trypsin-Inhibitoren (Ole e 1)
2. Antiparallele  $\beta$ -Faltblätter direkt verbunden mit einer oder mehr  $\alpha$ -Helices: Bäume Gruppe 1, Lipocalin, Profilin, Küchenschabe Gruppe 2
3.  $\alpha+\beta$ -Strukturen, in denen die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Strukturelemente nicht direkt verbunden sind, wie Milbe Gruppe 1, Lysozym, Lactalbumin, Vespid (Wespe)-Gruppe 5
4.  $\alpha$ -Helices: Feld 1, Pollen Calmodulin [18]

Auch in diesen Untersuchungen konnten keine für Allergene charakteristischen strukturellen Eigenschaften nachgewiesen werden. Selbst wenn ein Protein einer der oben genannten Gruppen angehört, bedeutet das nicht, dass es ein Allergen ist.

#### 2.1.4.1 Nomenklatur

Allergene werden gemäß den Regeln der WHO/IUIS (World Health Organisation) (International Union of Immunological Societies) Allergen Nomenklatur [19] nach den taxonomischen Namen ihrer Quellen bezeichnet. Zuerst kommen die ersten drei Buchstaben der Gattung, dann der erste Buchstabe der Art und eine Nummer. Die Nummern werden in der Reihenfolge der Entdeckung des Moleküls vergeben, dieselbe Nummer wird für homologe Allergene aus verwandten Spezies verwendet. Das zuerst entdeckte Allergen des Weidelgrases (*Lolium perenne*) heißt demnach Lol p 1, das homologe Protein aus Wiesenlischgras (*Phleum pratense*) Phl p 1. Reichen die ersten drei bzw. der erste Buchstabe nicht aus, um die Art oder die Gattung eindeutig anzugeben, wird ein weiterer Buchstabe angehängt, z.B. bei den Wespenallergenen (*Vespula vidula* Ves vi x und *Vespula vulgaris* Ves v x).

Moleküle, auf die mehr als 50 % der Patienten allergisch reagieren, werden als Majorallergene bezeichnet, auf Minorallergene reagieren nur weniger als 10 % der Allergiker. Bei verwandten Allergenquellen (Gräsern, Milben usw.) gibt es kreuzreaktive Proteine, das heißt, Patienten, die auf eine Art reagieren, reagieren auch auf die Verwandte, obwohl sie zuvor noch nie Kontakt mit der Spezies hatten. Antikörper gegen Proteine aus Art 1 binden auch die Proteine der zweiten Art über gleiche oder ähnliche Epitope. Die Pollen vieler Grasarten enthalten z.B.



ein Protein, das mit Antikörpern gegen Phl p 5 reagiert. Diese Allergene werden zusammengefasst als „Gruppe 5-Allergene“ bezeichnet. Die Zusammenfassung in einer Gruppe beruht vor allem auf ähnlichen immunologischen Eigenschaften (Antikörperbindung) und auf ähnlichen molekularen Massen.

Ein Allergen einer Spezies kann aus mehreren Isoallergenen bestehen. Sie sind anhand der molekularen Masse nicht zu unterscheiden und werden auch von denselben Antikörpern erkannt. Sie haben aber verschiedene isoelektrische Punkte und unterschiedliche Aminosäuresequenzen. Bei einer Sequenzidentität von 67 % oder darüber gelten zwei Proteine als Isoallergene, es gibt aber Ausnahmen und Grenzfälle [20].

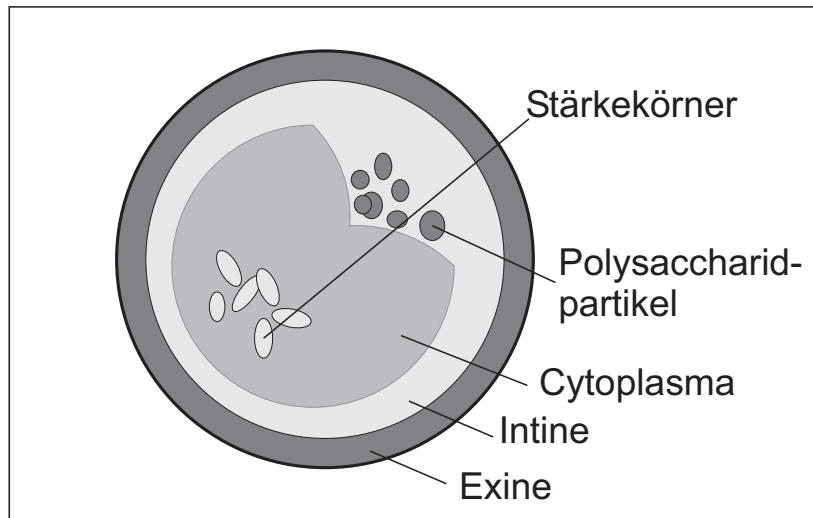
### 2.1.5 Pollen

Pollen sind die Träger des männlichen Erbguts einer Pflanze. Die Verbreitung kann über Bienen und andere Insekten erfolgen; in diesem Fall sind die Pollen relativ groß und haften am Körper der Tiere, von denen sie weitergetragen werden. Insektenbestäubte Pflanzen haben meist bunte, duftende Blüten. Ihre Pollen verursachen nur wenige Allergien. Für den Allergiker relevant sind die Pollen der windbestäubten (anemophilen) Pflanzen. Sie sind klein, werden durch die Luft transportiert und vom Menschen eingeatmet. Windbestäubt sind etwa ein Zehntel der 250 000 Pollenproduzenten, zum Beispiel Bäume wie Birke und Erle, Kräuter, Gräser und Getreide. Sie produzieren Pollen in großen Mengen. So enthält eine Roggenähre bis zu 4,2 Millionen Pollenkörner [21]. Die Körner können über weite Strecken transportiert werden, Graspollen fliegen bei einem Wind von 10 m/s bis zu 175 km weit.

#### 2.1.5.1 Aufbau eines Pollenkorns

Pollen sind von einer sehr stabilen Doppelschicht umgeben. Die äußere Hülle, die Exine, zeigt eine artspezifische Morphologie und besteht aus dem lipophilen Sporopollenin, das sehr resistent gegen äußere Einflüsse ist. Pollen können deshalb mehrere hundert Jahre unbeschädigt überstehen. Die innere Schicht, die Intine, umschließt das Cytoplasma mit den Zellorganellen wie Kern, Stärkekörner und Polysaccharidpartikel. In der Exine gibt es Mikrokanäle, die Exine und Intine verbinden, und Poren (bei Gräsern eine), durch die das Pollenschlauchwachstum möglich ist [22].

Pollen enthalten etwa 37 % ([24], keine Einheitsangabe, vermutlich w/w) Kohlenhydrat, 20 % Protein, 4 % Lipide, 3 % Mineralien und 36 % Wasser. Welcher Anteil von diesen Komponenten bei wässriger Extraktion in Lösung geht, ist nicht bekannt. Stärke wird während der Pollenentwicklung eingelagert. Bei *Lolium perenne* enthält der reife Pollen nur Amyloplasten mit einem einzelnen Stärkekorn. Auch lösliche Zucker wie Glukose, Fruktose und Sucrose konnten in



**Abbildung 2.2:** Aufbau eines Pollenkorns [23]

Pollen verschiedener Arten nachgewiesen werden [25]. Sie können durch Abbau der Stärke entstehen und hängen mit der Dehydrierung der Pollen zusammen [26]. Die Lokalisation der Allergene in den Pollen ist schwierig, da eine streng wasserfreie Fixierung notwendig ist, um zu verhindern, dass die wasserlöslichen Allergene sofort ausgewaschen werden [27]. Allergenfreisetzung erfolgt bei Kontakt mit Feuchtigkeit, zum Beispiel auf der menschlichen Schleimhaut. Osmotische Kräfte führen zur Freisetzung von Stärkekörnern (Amyloplasten) durch die Pore. Diese Partikel tragen Allergene an ihrer Oberfläche [28]. Bei hoher Luftfeuchte und Regen entsteht ein allergenhaltiges Aerosol in der Luft. Liegen in diesem Aerosol Kohlenstoffpartikel (z.B. Dieselruß) vor, können Allergenmoleküle an diese binden und so eingeatmet werden [29]. Zusätzlich enthalten die Pollen Enzyme (Proteasen, Glucosidasen, Lyasen [30]), die die Epithelzellen der Atemwege schädigen können [31]. Die Aktivität solcher Proteasen konnte in Graspollenextrakten nachgewiesen werden [32]. Petersen et al. vermuten, dass Phl p 1 in dieser Weise wirkt [33].

Die Menge an Allergen im Pollen kann durchaus unterschiedlich sein [34], abhängig vom Jahr der Pollenernte. Genauso schwankt der Gehalt an Zucker.

### 2.1.5.2 Entwicklung des Pollens

Acht Stadien der Pollenentwicklung wurden wie folgt definiert [35]:

1. Tetradenstadium, Dauer etwa 5 Tage
2. freie Spore: Mikrosporen (Keimzellen) mit dünner Exine, Durchmesser bei

*Lolium* 18  $\mu\text{m}$ , Dauer: weniger als 1 Tag

3. Prevakuolisieretes Stadium: Exine und Pore sind erkennbar, Dauer: weniger als ein Tag
4. Frühes vakuolisieretes Stadium: Vakuolen sind vorhanden, deren Durchmesser bis zur Hälfte des Pollenkorns reicht, Dauer ca. 2 Tage
5. Mittleres vakuolisieretes Stadium: Vakuolen füllen das Korn, „Siegelring“-Stadium, Dauer ca. 2 Tage
6. Spätes vakuolisieretes Stadium: Cytoplasma bildet sich, eiförmiges Pollenkorn, Durchmesser ca. 28  $\mu\text{m}$ , Dauer ca. 2 Tage
7. Frühes Reifestadium: erste Pollenmitose hat stattgefunden, Cytoplasma füllt das Korn
8. Spätes Reifestadium: zweite Mitose hat stattgefunden, Pollenkörner sind dreizellig, das Cytoplasma mit Stärkekörnern füllt den Pollen, durchschnittlicher Durchmesser: 30  $\mu\text{m}$

Die beiden letzten Stadien dauern zusammen etwa eine Woche, die genaue Dauer wurde nicht bestimmt. Während dieser Zeit finden zwei Mitosen statt, und Reserven (Stärke) werden eingelagert.

Während des Endstadiums der Pollenreife in den Antheren erfolgt auch die Einlagerung von Allergenen, beginnend zum Zeitpunkt der Beladung mit Stärke. Die erfolgt etwa 5-6 Tage nach der Meiose, das sind 6 Tage vor der Freisetzung der Pollen. Das allergene Potential ist beim reifen Pollen dann am größten. Auch der Proteingehalt steigt während der Pollenreife ständig an, am höchsten ist er in reifen Pollen [36].

### 2.1.6 Allergene des Weidelgrases

Graspollenallergene im allgemeinen und die des Weidelgrases sind schon lange bekannt und gut untersucht [37]. Erste Arbeiten dazu stammen aus den sechziger Jahren von Johnson und Marsh [38, 39, 40] und wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen weitergeführt. Durch Identifizierung von Strukturgenen, die ein Allergen codieren, konnten die Sequenzen mehrerer Majorallergene ermittelt werden [41]. Die Lage von Epitopen wurde durch Reaktion von verschiedenen Bruchstücken mit Antikörpern bestimmt. Sekundär- und Tertiärstrukturen können in einigen wenigen Fällen durch Computersimulation und/oder Vergleich mit bekannten Proteinen ähnlicher Sequenz erschlossen werden. Auf ähnliche Weise werden Aussagen über die Funktionen der Allergene in der Pflanze getroffen.

Bezeichnung	Molmasse	pI's	Funktion	glykos.	SwissProt- Nummer
Lol p 1	27 kD (35)	ca. 5	-	ja	P14946
Lol p 2	11 kD	ca. 5	-	nein	P14947
Lol p 3	11 kD	9-9,4	-	nein	P14948
Lol p 4	ca. 60 kD	9	-	ja	
Lol p 5a	31 kD	9	-	nein	Q40240
Lol p 5b	31 kD	7	Ribonuclease [42]	nein	Q40237
Lol p 5c	27,5	6,7	-	nein	Q9SC99 (TrEmbl)
Lol p 10	?	?	Cytochrom c	-	
Lol p 11	18	5,5	-	ja	-

**Tabelle 2.1:** Übersicht über die Allergene des Weidelgrases (Swissprot: [www.expasy.ch](http://www.expasy.ch))

### 2.1.6.1 Lol p 1

Lol p 1 wurde zum ersten Mal 1965 von Marsh und Johnson [38] isoliert und charakterisiert. Howlett et al. (1981) [43] beschreiben es als Glykoprotein bei 30 kD (5% Kohlenhydratanteil) bestehend aus 3 Isoallergenen mit pIs von 5,1; 5,3 und 5,5; Cottam [44] gibt 1991 die Molmasse mit 31 kD und den pI mit 5,8 an. Das acide Glykoprotein besteht aus 240 Aminosäuren (mature Form), die Molmasse beträgt 26,6 kD. Durch die Glykosylierung erscheint es in der SDS-Page bei 35 kD. Die Aminosäuresequenz wurde fast gleichzeitig von Perez et al. [45] und Griffith et al. [46] aufgeklärt. Der überdurchschnittlich hohe Anteil an Glycin und Lysin weist auf ein sekretiertes Protein hin. Der saure isoelektrische Punkt (pI) wird durch 14 Glutamat- und 19 Aspartatreste verursacht, was in Poacee-Gräsern sehr verbreitet ist [47]. Die 99 C-terminalen Aminosäuren zeigen Sequenzähnlichkeiten mit Lol p 2 und 3, die letzten 28 Aminosäuren enthalten ein Epitop. Im N-terminus liegt eine cysteinreiche Region, 7 Cystein an den Positionen 41, 61, 74, 77, 82, 88 und 133 erlauben die Bildung von Schwefelbrücken zur Strukturstabilisierung. Es existieren mehrere Isoformen von Lol p 1 (mindestens zwei) [45], die sich sehr ähnlich sind. Nur vier Aminosäuren sind verschieden, was sich in leicht verschiedenen pI's bemerkbar macht.

Die Kohlenhydratkomponente ist wahrscheinlich für die beobachtete Kreuzreaktivität mit Bromelain verantwortlich [48]. Sie besteht aus Glukose, Galactose, Mannose, Arabinose und N-Acetylglucosamin im Verhältnis 3:3:1:2:2:1 [43]. Obwohl die Sequenz Ähnlichkeiten mit Proteinasen und Cysteinasen aufweist, zeigt Lol p 1 keine enzymatische Aktivität. Durch sein Vorkommen auf der Oberfläche der Pollen wird eine Funktion in der Pollen-Stigma-Erkennung vermutet [49]. Etwa 95 % aller Graspollenallergiker haben spezifisches IgE gegen Lol p 1.

Damit ist es das Hauptallergen des Weidelgrases, wo es ungefähr 10 % des gesamten Pollenproteins ausmacht [47]. Durch Modellierung [50] wurde Lol p 1 den  $\beta$ -Expansinen zugeordnet, einer Stoffgruppe, die vermutlich an der Lösung von Zellwänden und bei Zellvergrößerungen zum Wachstumsprozess der Pflanze beteiligt ist. Die Cellulose bindende Region (CBD) besteht aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, die in einer Sandwich-Struktur arrangiert sind. Jedes der Faltblätter enthält vier Stränge, einer ist geknickt und gehört zu beiden Blättern. Die von den menschlichen Antikörpern erkannten Epitope könnten in den gleichen Regionen liegen wie die CBD.

Gruppe 1 Allergene sind stabil und zeigen zellwanddehnende Effekte, aber keine proteolytischen Eigenschaften [51], obwohl sie strukturell mit den  $\beta$ -Expansinen verwandt sind [52]. Durch Spaltung von rekombinantem Phl p 1 und ELISA-Test der Bruchstücke mit Allergikerseren wurden vier konformationsbedingte Epitope [33] und mehrere sequenzielle Epitope identifiziert, die aber weniger Bedeutung haben. Disulfidbrücken spielen für die Allergenität eine Rolle. Reduktion und Carboxymethylierung der SH-Gruppe führt zu einer Reduktion der IgE-Bindungskapazität um 25 %.

#### 2.1.6.2 Lol p 5

Das zweite Majorallergen des Weidelgrases ist das Gruppe 5 Allergen. Etwa 90% der Gräserpollenallergiker haben Antikörper dagegen. In den 60er und 70er Jahren war noch keine Unterscheidung zu Lol p 1 möglich aufgrund der sehr ähnlichen Molmassen der Proteine. Ford [37] entdeckte 1986 durch Serendetektion im SDS-Page-Blot in der Region zwischen 28 und 35 kD mehrere sehr reaktive Banden. Erst in den 90er Jahren wurden diese Banden von verschiedenen Arbeitsgruppen Isoallergenen von Lol p 5 zugeordnet. Zuerst beschrieben wurde Lol p 5a [53], noch unter der Bezeichnung Lol p 1b. Es besteht aus 283 Aminosäuren, hat eine Molmasse von 31 kD (SDS-PAGE) und einen pI von ca. 9. Es ist besonders reich an Alanin (23 %) und Prolin (13 %), nicht glykosyliert und zeigt keine Homologien zu Lol p 1, 2 oder 3, dafür starke Kreuzreaktivität mit Phl p 5 (Gruppe 5 Allergen aus *Phleum pratense*) was erste Hinweise zur Einordnung zu den Gruppe 5 Allergenen ergab. Lol p 5a konnte in den Stärkekörnern lokalisiert werden [53]. Es wird als Precursor im Cytosol synthetisiert und gelangt dann in den Amyloplasten. Die wiederholte Sequenz Pro-Ala-Thr kann auf eine strukturelle Funktion hinweisen. Weitere vermutete Funktionen wären eine Rolle in der Pollenentwicklung, beim Pollenschlauchwachstum, bei der Pollen-Stigma-Erkennung oder der Stärkemobilisierung während der Germination. Transgene Pflanzen, in denen die Expression von Lol p 5 unterdrückt wurde, zeigten eine normale Pollenentwicklung, was gegen diese Theorie spricht [54, 55].

Ong et al. [56] beschrieben 1993 das Lol p 5b, mit einer Molmasse von 31,3 kD (mature form), 314 Aminosäureresten und einem pI von 7,1. Es scheint ein

Strukturprotein zu sein, worauf eine Alanin-reiche Region hinweist. Zu Lol p 5a ist Lol p 5b 66 % identisch und zu 80 % ähnlich. Immunologisch sind die beiden Proteine verschieden, haben aber gemeinsame Epitope. Eine mögliche Begründung wären artinterne genetische Variationen.

Lol p 5c ist das kleinste der Gruppe 5 Allergene mit 27,5 kD und 276 Aminosäuren. Der berechnete pI liegt bei 6,7. Zu Lol p 5a besteht 95 % Sequenzidentität, zu Lol p 5b nur 56,6 % [57]. Lol p 5c hat 11 eigene Aminosäurereste, davon ein Cystein, was zu verschiedener Sekundär-/Tertiärstruktur durch eine zusätzliche Disulfidbrücke führen kann. Inhibierung von Patientenseren mit Lol p 5c führt zu einer reduzierten Erkennung von Banden in der 50 kD Region in der SDS-PAGE, was auf die Bildung von Dimeren oder ein immunologisch verwandtes Protein hindeutet.

Lol p 5c scheint eine stärkere klinische Relevanz zu besitzen als Lol p 5a, die IgE-Bindung ist bei 72 % der Patienten stark, während auf Lol p 5a nur 9,2 % stark reagieren.

Ragashankar et al. gelang es 2002 [58], die Struktur eines 11 kD-Fragments von rPhl p 5b (rekombinantes Phl p 5b) mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären. Kristalle von rPhl p 5 wurden durch Dampf-Diffusionstechnik aus einer Mischung von Proteinlösung und Phosphat (1,6 M, pH 4,0, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ATP) gewonnen. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen spalteten sich von rPhl p 5 zwei Fragmente ab, was auf Verunreinigungen mit einer Protease oder auf Autoprotolyse zurückzuführen sein kann. Das untersuchte Bruchstück zeigte im Patiententest dieselbe allergene Aktivität wie das Gesamtprotein. Es besteht ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices und bildet ein durch eine Schwefelbrücke stabilisiertes Dimer. Zwischen den Gruppe 5 Allergenen besteht eine starke Kreuzreaktivität durch Ähnlichkeit in der aminoterminalen Sequenz [59].

Neben diesen beiden Majorallergenen enthält Weidelgras mehrere weniger gut erforschte Allergene.

**Lol p 2** wurde 1989 von Ansari et al. [60] beschrieben. Es ist ein acides Protein aus 97 Aminosäuren, einem pI von 5,0-5,3 und einem berechneten Molekulargewicht von 10882 Da (Edman-Abbau). Es besteht aus mindestens zwei Isoformen [61], die durch Elektrophorese getrennt werden können. Das Allergen enthält weder Cystein noch Glutamin, es gibt kein Anzeichen von Glykosylierung. Etwa 45 % der Allergiker besitzen spezifische Antikörper gegen Lol p 2 [62], es gibt keine Kreuzreaktivität mit Lol p 1.

**Lol p 3**, ebenfalls 1989 von Ansari beschrieben [63], ist Lol p 2 sehr ähnlich. Es besteht aus 97 Aminosäuren, 57 davon sind mit Lol p 2 gleich (59% Identität) [61]. Daraus erklärt sich die starke Kreuzreaktivität der beiden Allergene. Lol p 3 ist eine Gruppe von basischen Proteinen (pI 9,0-9,4), die häufigsten sind Lol p 3a (pI 9,4) und Lol p 3b (pI 9,0). Die berechnete Molmasse von Lol p 3

liegt bei 10909 Da. Es enthält keine Cysteinreste und ist nicht glykosyliert. Lol p 2 und Lol p 3 haben gemeinsame Segmente mit Lol p 1, zeigen aber keine Kreuzreaktivität.

**Lol p 4** ist ein Glykoprotein mit einer Molmasse von 57 kD [43, 64] und einem pI größer 9. Über 70 % der Pollenallergikerseren enthalten Antikörper gegen Lol p 4. Der Kohlenhydratanteil liegt bei 12 %, der Eiweißanteil enthält 12 Methionin-, 31 Lysin- und 24 Argininreste. Es bestehen Kreuzreaktivitäten zu Gruppe 4-Allergenen zahlreicher anderer Gräser [65].

**Lol p 11** besteht aus mehreren Isoformen mit einem Molekulargewicht von 18 kD und einem pI zwischen 5 und 6 [66]. Es enthält einen Kohlenhydratanteil, der ca. 8 % der Gesamtmasse ausmacht. Bei einigen Patienten treten Antikörper gegen diesen Kohlenhydratanteil auf, die zu Kreuzreaktivitäten mit anderen Pollenallergenen und auch Nahrungsmittelallergenen führen können.

Der Eiweißanteil besteht aus 134 Aminosäureresten, darunter 6 Cysteine, was zur Ausbildung von drei potentiellen Schwefelbrücken befähigt. Sequenzhomologien zu anderen Grasallergenen sind nicht bekannt. Im Immunoblot wird es selten erkannt, vielleicht aufgrund von Konformationsänderungen während der SDS-PAGE.

## 2.2 Erhöhte Ozonwerte und ihre Auswirkungen auf Pflanzen

### 2.2.1 Erhöhte Ozonwerte

Ozon ( $O_3$ ) zählt zur Schadstoffgruppe der Photooxidantien zusammen mit PAN (Peroxyacetylnitrat) oder PPN (Peroxypropionylnitrat). Diese Stoffe entstehen unter Lichteinfluss in Anwesenheit von  $NO_x$  vor allem aus flüchtigen organischen Kohlenwasserstoffen (VOC). Ozon ist ein farbloses giftiges Gas und wurde 1840 von Prof. Schönbein (Basel) entdeckt.

Der Hauptanteil des Ozons (90 %) der Atmosphäre befindet sich in der Stratosphäre (ca. 15-50 km über dem Erdboden). Dort absorbiert es die ultraviolette Strahlung der Sonne (230-295 nm). Die Zerstörung dieser Ozonschicht durch anthropogene Spurengase wie FCKW's bedingt eine Zunahme der UV-B Strahlung auf der Erdoberfläche und damit Schäden an Mensch, Tier und Pflanzen. Die restlichen 10 % des atmosphärischen Ozons befinden sich in der Troposphäre (0-15 km über dem Erdboden). Es wird entweder aus der Stratosphäre eingetragen oder entsteht durch photochemische Prozesse in der Troposphäre. Die Bildung von Ozon erfolgt durch eine von  $NO_x$  katalysierte photochemische Oxidation von CO, Methan oder höherer Kohlenwasserstoffe.

Aufgrund der Reaktionsmechanismen in Tabelle 2.2 tritt das Tagesmaximum der

$\text{CH}_4 + 2 \text{O}_2 + 2 \text{NO} \rightarrow$ $\text{HCHO} + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{NO}_2$	Oxidation von Methan
$2 \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{O}^*$	Photochemisches NO-NO <sub>2</sub> Gleichgewicht
$\text{O}^* + \text{O}_2 + \text{M} \rightarrow \text{O}_3 + \text{M}$	Beim Zusammentreffen von Sauerstoffradikal und -molekül ist ein dritter inerte Stoßpartner (M) wie Stickstoff zur Aufnahme von Energie nötig. Fehlt er, zerfällt das Ozonmolekül sofort wieder.
$\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{O}_2 + \text{NO}_2$	Zerfall von Ozon bei Dunkelheit

**Tabelle 2.2:** Entstehung und Zerfall von Ozon

Ozonwerte um die Mittagszeit auf.

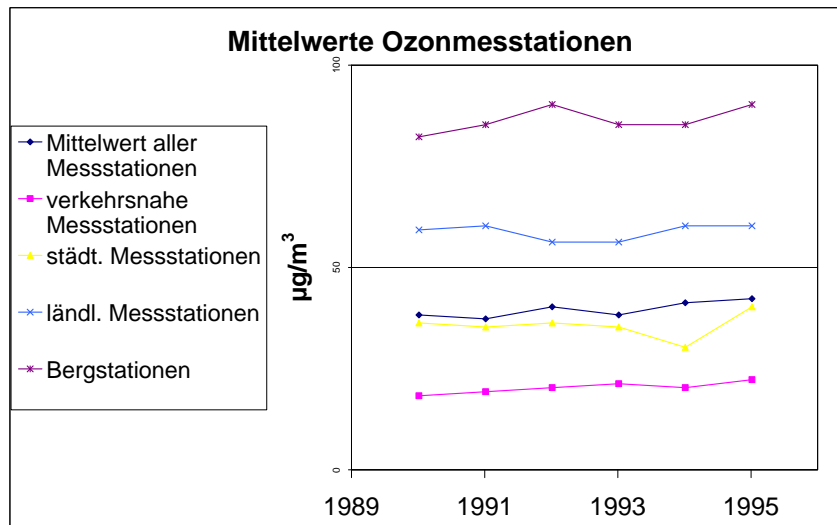
### 2.2.2 Auftreten von erhöhten Ozonwerten

In den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde zum ersten Mal das Auftreten von photochemischem Smog in Los Angeles beobachtet (deshalb „Los Angeles Smog“). Die Einwohner bemerkten einen sauren, die Augen irritierenden Dunst. Die Analytik war aufgrund wenig entwickelter Messmethoden nicht einfach. Ozonwerte wurden z.B. durch das Auftreten und die Tiefe von Rissen in Gummistreifen bestimmt. In den 50er Jahren wurden dann von Stephens et al. [67] Peroxyacetylnitrat (PAN) und Ozon als Hauptbestandteile des photochemischen Smogs nachgewiesen. In L.A. wurde als Spitzenwert mittags 580 ppb ( $1160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) gemessen, in Deutschland sind schon 275 ppb ( $550 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) aufgetreten.

Von 1978 bis 1990 hat sich die mittlere Ozonkonzentration von knapp unter 40 ppb auf 50 ppb erhöht. Dabei nahm der Gehalt in Ballungsgebieten und anderen belasteten Gebieten weniger stark zu (1977-1983: 3 %) als in den ländlichen Gebieten (selber Zeitraum: 16 %). Überhaupt fällt auf, dass in Gebieten fern von Industrie und Verkehr (z.B. auf der Zugspitze) die Ozonwerte höher liegen als in Industrieregionen.

In industriellen Regionen kommt es auch nachts zur fortgesetzten Emission von NO durch Autos und Industrie. Durch NO wird vorhandenes Ozon fast sofort in O<sub>2</sub> und NO<sub>2</sub> umgewandelt. NO<sub>2</sub> ist langlebiger als O<sub>3</sub> und kann nachts unzersetzt über weite Strecken transportiert werden. Am Tag wird dann unter Lichteinfluss





**Abbildung 2.3:** Übersicht über die Ozonwerte in verschiedenen Regionen (Quelle: Bundesumweltamt)

wieder Ozon gebildet. In ländlichen Gebieten fehlt NO zum Abbau des Ozons. Deshalb gibt es an quellenfernen Orten oft höhere Ozonbelastungen als in quellenahen. Betroffen sind hier vor allem Reinluftgebiete. Um das Auftreten hoher Ozonwerte zu verhindern, muss die Emission von Stickoxiden eingeschränkt werden. Deshalb gilt bei einem Ozonwert von über  $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$  im Stundenmittel Fahrverbot für nicht schadstoffarme Fahrzeuge [68].

Ozon beeinträchtigt die Lungenfunktionen [69] vor allem von Kindern [70] und älteren Menschen. Entzündliche Schleimhautveränderungen führen zu einer erhöhten Permeabilität der Schleimhaut [71]. Die allergische Reaktion eines Asthmatikers kann durch Ozonexposition verstärkt werden, Ozon selbst führt aber zu keiner Reaktion [72, 73, 3].

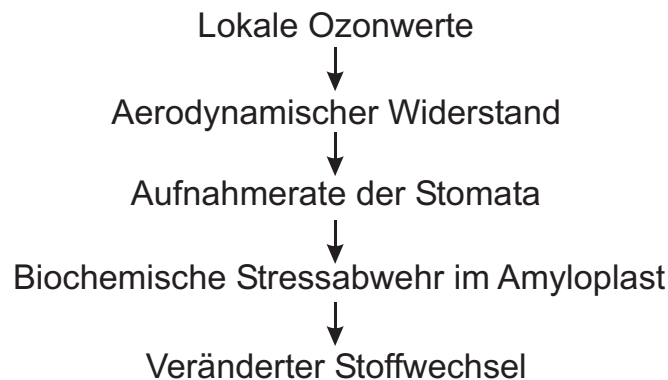
### 2.2.3 Auswirkungen von erhöhten Ozonwerten auf Pflanzen

Das Auftreten von Ozonschäden wurde zum ersten Mal 1952 im Osten der USA an Tabakpflanzen beobachtet. Die Blätter zeigten gelbe Verfärbungen und Chlorosen, die sie zum Einwickeln von Zigarren unbrauchbar machten. In den 50er Jahren konnten diese Phänomene auf Ozon zurückgeführt werden durch Vergleiche mit ähnlichen Schäden, die an Bohnen beobachtet wurden. Bis 1959

wurden analoge Krankheiten bei Grapefruit, Spinat, Roggen usw. entdeckt. In den letzten dreißig Jahren wurde die Sensivität verschiedener Nutzpflanzen und Bäumen untersucht. Als typische akute Ozonschäden bei hohen Konzentrationen wurden weißliche, blasse Flecken, Läsionen und Nekrosen, die zu Streifen zusammenwachsen können, beschrieben. Geringfügig erhöhte Ozonwerte während der Wachstumsperiode können zu vorzeitiger Blattalterung und reduzierter Ernte führen [74, 75].

### 2.2.3.1 Mechanismus der Schädigung

Der Ozongehalt der Luft wird üblicherweise 3-5 m oberhalb des Erdbodens bestimmt. Der Gehalt, dem die Pflanzen ausgesetzt sind, hängt von weiteren Faktoren ab [Abb. 2.4]. Der aerodynamische Widerstand beruht auf der Bildung einer



**Abbildung 2.4:** Einfluss von Ozon auf Pflanzen

Grenzschicht mit geringer Luftbewegung oberhalb einer Pflanzenschicht. Konvektion von Luftschichten verschiedener Temperatur sorgen für Durchmischung der Atmosphäre. Die Rauigkeit einer Pflanzenschicht führt dabei zu Wirbelbildung und besserer Durchmischung. Glatte Pflanzenschichten wie Wiesen oder Getreidefelder erzeugen dabei weniger Wirbel als z.B. Wälder mit verschiedenen hohen Bäumen. In einem Feld gibt es daher größere Ozongradienten [76].

Ozon tritt durch die Stomata in die Blätter von Pflanzen ein. Die Aufnahmerate hängt von der Art der Pflanzen und den Umweltbedingungen, vor allem Feuchte, ab. In der Pflanze löst sich Ozon zum Teil im Wasser auf den Zelloberflächen. Es bilden sich Radikale sowie verschiedene Ionen. Sie können Zellkomponenten und Membranbestandteile wie Proteine, SH-Gruppen der Aminosäuren oxidieren. Laut einer Simulation von Urbach et al. (1989) [77] erreichen noch 80 % des Ozons die Membran, 18 % das Cytosol und 2 % den Chloroplasten. Die Photosynthese wird durch Schädigung der Struktur der Chloroplasten gestört. Für die

CO<sub>2</sub>-Fixierung wichtige Enzyme wie Carboxylasen können in ihrer Aktivität gehemmt werden. Außerdem wird die Permeabilität von Membranen verändert [78]. Die Zusammensetzung der Proteine der Plasmalemma zeigt Veränderungen. Es wurde ein zusätzliches Protein beobachtet [79]. Assimilat wird in der gestressten Pflanze anders verteilt als in einer Ungestressten aufgrund von Schäden an den Speicherorganen der Pflanze [80].

Da Ozon ein natürlich vorkommendes Schadgas ist, haben Pflanzen Abwehrmechanismen, die Radikale abfangen und dem oxidativen Stress entgegenwirken können [81, 82]. Ascorbat ist ein wichtiger Radikalfänger, es wird zu Dehydroascorbat oxidiert. Über den Glutation-Cyclus wird Ascorbat wiederhergestellt. Weitere Abbaumechanismen setzen Carotinoide, Vitamin E und phenolische Komponenten ein. Erst wenn der Ozonwert so hoch ist, dass diese Systeme überfordert sind, treten Schäden auf. Wann dieser Fall eintritt, hängt von Art, Varietät und Individuum ab. Wichtige Faktoren sind auch Wasserversorgung, Temperatur und vor allem Luftfeuchte während des Ozoneinflusses. Nachts reagieren Pflanzen unempfindlicher als tagsüber, wenn die Stomata geöffnet sind. Pflanzen zeigen bei erhöhten Ozonwerten einen veränderten Stoffwechsel [83, 84]. Es gibt Aktivitätsveränderungen von Enzymen, die mit Stressabwehr verbunden sind, wie z.B. Superoxiddismutase (SOD). Die Ethylenproduktion ist deutlich erhöht [85, 86, 87] und es werden Gene von pathogen-related (PR) Proteinen aktiviert [88], wie  $\beta$ -1,3-Glucanase [89, 90, 91, 92]. Diese Reaktionen ähneln den Abwehrmechanismen gegen virale und mikrobiologische Pathogene [93, 94]. Breiteneder und Scheiner [5] zeigten 1998, dass das Gruppe 1 Allergen der Birke, Bet v 1, weitgehend homolog mit diesen PR-Proteinen ist, was für eine Funktion des Allergens in der Stressantwort der Birke spricht. Das eine Stressantwort mit erhöhtem Allergengehalt durch Luftschadstoffe ausgelöst wird, konnte nicht nachgewiesen werden [95].

Die Sensitivität von Pflanzen gegenüber Ozon hängt von der Art, Sorte und Kultivar ab und kann völlig unterschiedlich sein [96].

#### 2.2.4 Ozonschäden an Weidelgras

Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne Manhattan*) zeigt bei niedrigen (ambient) Ozonwerten mittlere Sensitivität. Die Blattflächen sind signifikant reduziert [97], es bilden sich braune Verfärbungen und Nekrosen. Dabei waren ältere und junge Blätter weniger betroffen. Bei Italienischem Weidelgras (*Lolium multiflorum*) zeigten sich bei Ozonwerten von 90 ppb über acht Stunden pro Tag keine sichtbaren Schäden. Allerdings ist das Trockengewicht pro Pflanze reduziert, ebenso wie die Blattfläche pro Pflanze und das Verhältnis von Wurzel zu Spross. Die Empfindlichkeit des Blattsystems wird durch eine erhöhte Assimilationsrate kompensiert.

Verschiedene Kultivare einer Pflanzenart können ganz unterschiedlich auf Ozonwerte reagieren, wie man an Kentucky Blue Gras [98] sieht.

### 2.2.5 Pollen und Luftschadstoffe

Untersuchungen zur Wirkung von erhöhten Ozonkonzentrationen auf die Entwicklung von Pollen zeigen, dass die Keimfähigkeit der Pollen eingeschränkt sein kann. In Mais ist der Gehalt an freien Aminosäuren im Pollen erhöht, vor allem Alanin, Prolin und Glutamat. Der Gehalt an reduzierenden und neutralen Zuckern geht nach 5-stündiger Ozonexposition zurück [99]. Dies kann auf die verringerte Photosyntheserate zurückzuführen sein. Auch Änderungen in der Allergenität und der Molmasse der Allergene wurde bei Exposition mit NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> und CO beobachtet [100].

Luftschadstoffe wirken auch auf reife Pollen *in vitro*. Bei Pollen, die mit polyaromatischen Partikeln beladen sind, wurde verstärkte Allergenfreisetzung, vermutlich durch morphologische Veränderungen am Pollen beobachtet. Begasung mit SO<sub>2</sub> bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeiten führt zu geringerer Allergenfreisetzung [4]. Begasung von reifen Maispollen mit Ozon führt zu geringerer Keimfähigkeit, einem höheren Anteil an freien Aminosäuren und geringerer Konzentration an reduzierendem Zucker [101]. Ähnliche Versuche mit *Dactylus glomerata*-Pollen zeigten keinen veränderten Allergengehalt bei Ozonbehandlung [102]. Auch ultrastrukturelle Veränderungen wurden beobachtet [103].

### 2.2.6 Ozonschäden an Weidelgraspollen

Seit 1994 werden in der Arbeitsgruppe „Allergene“ der Universität Paderborn Auswirkungen von erhöhten Ozonwerten während der Blütezeit auf den Allergengehalt und die Entwicklung von Weidelgraspollen untersucht.

#### 2.2.6.1 Allergengehalt

Zunächst wurde in einer Freilandstudie die Wirkung von Ozon auf Wildpflanzen von *Lolium perenne* überprüft. Dabei wurde der Gehalt an Gruppe 5 Allergen von Pflanzenpollen aus Schwerte (industrienaher Standort, niedrige Ozonwerte) und vom Velmerstot (Reinluftgebiet) verglichen. Die Allergenkonzentration im Reinluftgebiet betrug 33 ng/ $\mu$ g Gesamtprotein gegenüber 20 ng/ $\mu$ g am Standort Schwerte. Zusätzlich wurden in Open-Top Chambers am Velmerstot Pflanzen in gefilterter Luft kultiviert und mit Pflanzen aus dem Freiland verglichen. Auch hier waren die Allergenwerte unter Ozoneinfluss erhöht [104, 105, 6].

Bei solchen Versuchen muss beachtet werden, dass auch Parameter wie unterschiedliche Temperatur, Wasser- und Lichtverhältnisse und Bodenbeschaffenheit die Ergebnisse beeinflussen können. Deshalb wurde 1996 *Lolium perenne* in Closed-Top Chambers des Landesumweltamtes Essen-Kettwig [Abschnitt 3.1] einer Ozonkonzentration von 130  $\mu$ g/m<sup>3</sup> über den ganzen Tag ausgesetzt. Der Extrakt aus den begasten Pollen zeigt einen höheren Gehalt an Gruppe 5 Allergen und einen höheren Gesamtproteingehalt als die in gefilterter Luft gewachsenen

Vergleichspflanzen.

Dieses Experiment wurde 1997 wiederholt mit einem dem natürlichen Verlauf der Ozonwerte angenäherten Programm. Die Belastung mit  $130 \mu\text{g}/\text{m}^3$  war auf die Lichtphase begrenzt bei einer durchgängigen Grundlast von  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . In einer zweiten Versuchsreihe erhielten die Pflanzen  $220 \mu\text{g}/\text{m}^3$  als Spitzenwert über 4 Stunden, so dass die Tagesdosis an Ozon dieselbe war. Der Trend der Ergebnisse vom Vorjahr wurde bestätigt [106].

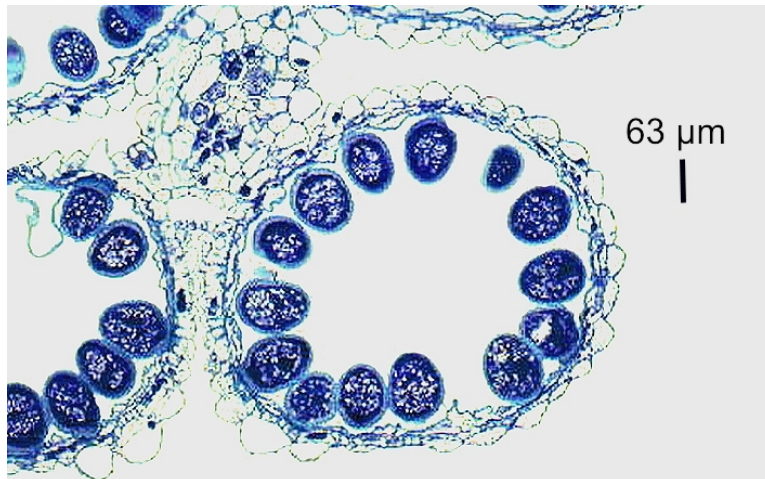
	Gefilterte Luft	130/40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ O <sub>3</sub>	220/40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ O <sub>3</sub>
$\mu\text{g}$ Protein/g Einwaage	117.330	108.740	97.500
$\mu\text{g}$ Gr.5/g Einwaage	1.046	1.325	1.323
ng Gr.5/ $\mu\text{g}$ Protein	8,92	12,18	13,56

**Tabelle 2.3:** Gehalt an Gesamtprotein und Gruppe 5 Allergen in *Lolium perenne* Pollen nach 28 Tagen Exposition (1997)

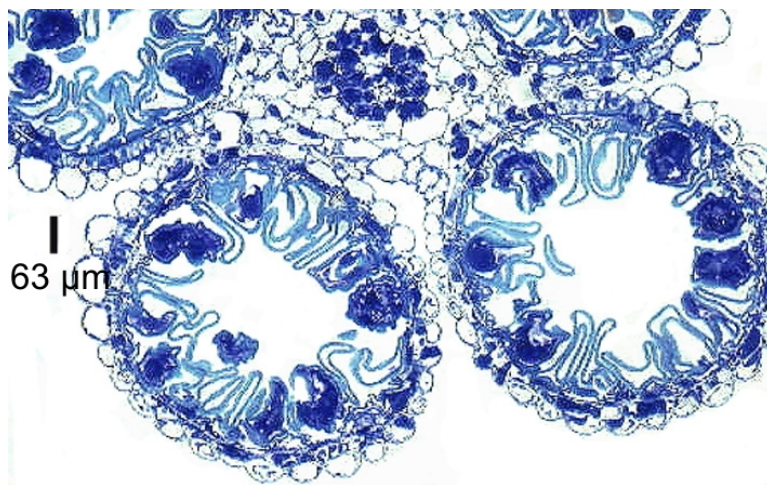
### 2.2.6.2 Histologische Schäden

Ozon kann im Pollen eine unvollständige Entwicklung auslösen. Die geschädigten Pollen lagern in diesem Fall keine Stärke ein, was durch Fehlen des Amyloplasten erkennbar wird. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Masuch [108] zeigen, dass bei kurzzeitigen Spitzenbelastungen wesentlich mehr geschädigte Pollen vorhanden (58 %) sind als in Antheren, die sich in gefilterter Luft entwickeln konnten (9 %). Bei mittlerer Belastung über den ganzen Tag ist die Schädigung weniger ausgeprägt (18 %).

Fehlende Stärkeeinlagerung wird auch bei Trockenstress während der Meiose in Weizen beobachtet [109].



(a) gesunde Anthere



(b) geschädigte Anthere

**Abbildung 2.5:** Mikroskopaufnahmen von gesunden und ozongeschädigten Pollen [107]

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Ozonisierungskammern und Pflanzenmaterial

#### 3.1.1 Begasungskammern LUA Essen

Das Landesumweltamt Essen verfügt über 12 sechseckige Freilandbegasungskammern (Seitenlänge 1,2 m, Grundfläche 36,65 m<sup>2</sup>, Höhe 2,6 m) mit Betonsockel und einem Glasaufbau mit Flügeltüren. Die Pflanzen stehen auf einem Drehteller, der sich sechsmal pro Minute dreht, um einen gleichmäßigen Lichteinfall zu gewährleisten. Beschattung ist über Rollos möglich. Die Luftzufuhr erfolgt an der Kammerdecke, ein Ventilator mit variabler Drehgeschwindigkeit (0,5-1,5 m/s) sorgt für ausreichende Durchmischung. Die Verweilzeit der Luft in der Kammer beträgt 2 Minuten. Als Zuluft wird Außenluft verwendet, die durch verschiedene Filter geleitet wird, zunächst durch einen Regenabweiser, Grob- und Feinstaubfilter, Aktivkohle, Puratex und Aktivkohle mit KOH zur Oxidation von NO zu NO<sub>2</sub> und zur Neutralisation von sauren Bestandteilen der Luft. Die Abluft wird durch einen Ventilator abgesaugt.

Der Zuluft können je nach Problemstellung verschiedene Schadgase zugesetzt werden. Ozon wird durch einen Ozonisator (OG5, VTU, Rheinbach) durch elektrische Entladung aus reinem Sauerstoff erzeugt. Die in den Kammern erhaltene Gaskonzentration wird von einem Ozonanalysator (Dasibi, Env. Corp. Colorado, Typ 1008) über UV-Absorption gemessen. Nacheinander werden die Ozonmengen in allen Kammern bestimmt, wobei Teflonventile alle 5 Minuten eine Kammer weiterschalten. Zum Durchspülen der Leitungen sind 3 Minuten notwendig, weitere 2 Minuten um den Messwert zu erhalten. Ist- und Sollwerte in den Kammern werden verglichen und geregelt. Alle 22 h erfolgt eine Kalibrierung des Messgerätes [74].

Vorteile dieser Freiluftkammern sind die naturnahen Licht- und Temperaturverhältnisse, die Möglichkeit zur genauen Dosierung verschiedener Schadgase und

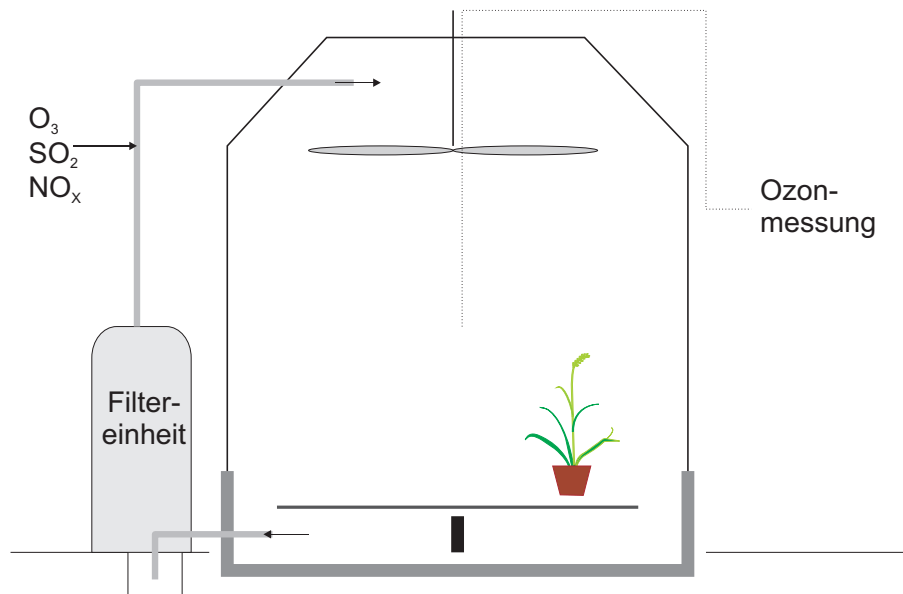


Abbildung 3.1: Begasungskammern LUA Essen

die große Menge an Pflanzen, die hier exponiert werden können. Allerdings ist durch die Witterungsabhängigkeit keine Reproduzierbarkeit der Versuche gegeben. Die Kammern können nur zwischen Mai und September genutzt werden.

### 3.1.2 Begasungskammern Paderborn

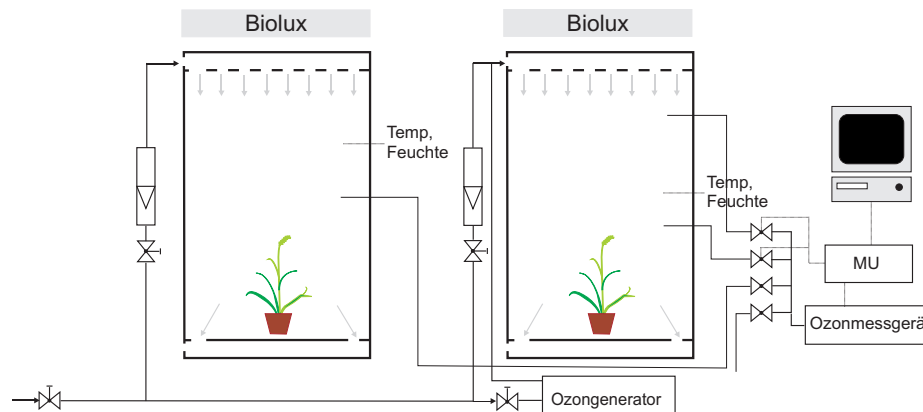
#### 3.1.2.1 Aufbau

Um das ganze Jahr über Pollen von Kontroll- und ozonisierten Pflanzen gewinnen zu können, wurden zwei Begasungskammern in Betrieb genommen. Ein Kellerraum garantiert eine gleichbleibende Temperatur von 20 °C, ohne dass Temperierung nötig ist.

Die Kammern (Höhe 170 cm, Breite 130 cm, Tiefe 85 cm) bestehen zur besseren Beleuchtung aus Plexiglas. Auf einer Lochplatte 10 cm oberhalb des Bodens stehen die Pflanzen, die Abluft wird darunter direkt in den Abzug geführt. Die Zuluft liegt unter der Deckenplatte jeder Kammer, eine Lochplatte 10 cm unterhalb sorgt für gute Verteilung und Durchmischung in den Kammern (Abb. 3.2).

Über Druckminderer und Strömungsmesser (Rotameter) wird ein Luftstrom von 4-5 m<sup>3</sup>/h eingestellt, was einem zweimaligen Luftaustausch pro Stunde





**Abbildung 3.2:** Begasungskammern Paderborn

entspricht. Bei der Ozonkammer wird die Zuluft mit ozonangereicherter Luft vermischt, um Konzentrationen im ppb-Bereich, wie sie natürlich vorkommen, zu erhalten. Das Ozon wird in einem Ansyco-Ozonisator aus gefilterter temperierter Luft durch Aufspaltung von Sauerstoffmolekülen mit UV-Licht und anschließende Rekombination erzeugt. Über die manuelle Regelung der Stromstärke oder durch Steuerung mittels PC können verschiedene Ozonmengen aufgegeben werden. Die bei einer voreingestellten Luftmenge von  $4 \text{ m}^3/\text{h}$  erhaltenen Ozonkonzentrationen in der Kammer sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Die Ozonwerte werden mit einem Ansyco-Messgerät M O3 41 durch UV-Absorption abwechselnd im Prüfgas und in ozonfreier (gefilterter) Luft als Nullabgleich bestimmt. Durch fünf Teflon-Magnetventile und daran angeschlossene Teflonschläuche können abwechselnd die verschiedenen Messstellen - Außenluft, Kontrollkammer und an mehreren Punkten der Ozonkammer - gemessen werden. Dazu wird der Schlauch zunächst 2 Minuten mit Prüfluft gespült, dann wird der sich innerhalb von weiteren 40 Sekunden am Messgerät einstellende Wert im PC gespeichert und das nächste Ventil geöffnet.

Der Ozongehalt wird nicht über die Messwerte geregelt, da das Messsystem so träge ist, dass es zu einer Aufschaukelung kommen könnte. Stattdessen werden über den PC Stromwerte für den  $\text{O}_3$ -Generator abhängig von der Tageszeit vorgegeben. Der Generator erzeugt dann einen relativ konstanten Ozonwert ( $\pm 10 \text{ ppb}$ ) in der Kammer. Es können der Natur nachempfundene Tagesprogramme gefahren werden, nachts kann der Ozonwert auf null gedrosselt werden. Der Messrechner erfasst zusätzlich zu den Ozonwerten die Temperatur und die Luftfeuchte in jeder Kammer.

Pflanzen brauchen Licht mit hohem Rotanteil, um die Lichtreaktion in ihren Blättern ablaufen zu lassen. Daher befinden sich über jeder Kammer 10 Leucht-

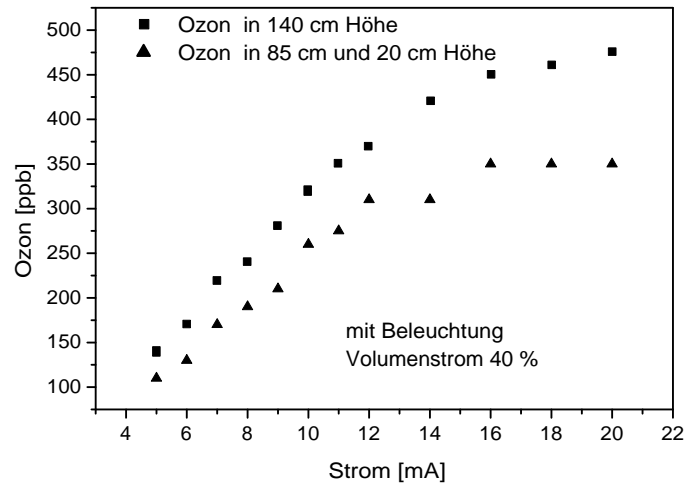


Abbildung 3.3: Ozonwerte in Abhängigkeit vom Generatorstrom

stoffröhren Biolux (Osram), deren Emissionsspektrum dem des Sonnenlichtes ähnelt, aber wesentlich weniger intensiv ist. Die Luxwerte nehmen vom Boden der Kammern hin zu den Lichtquellen annähernd exponentiell zu (Abb. 3.4).

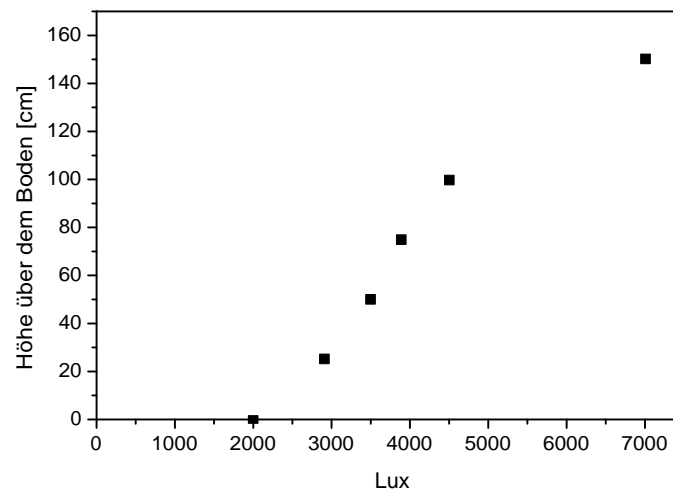
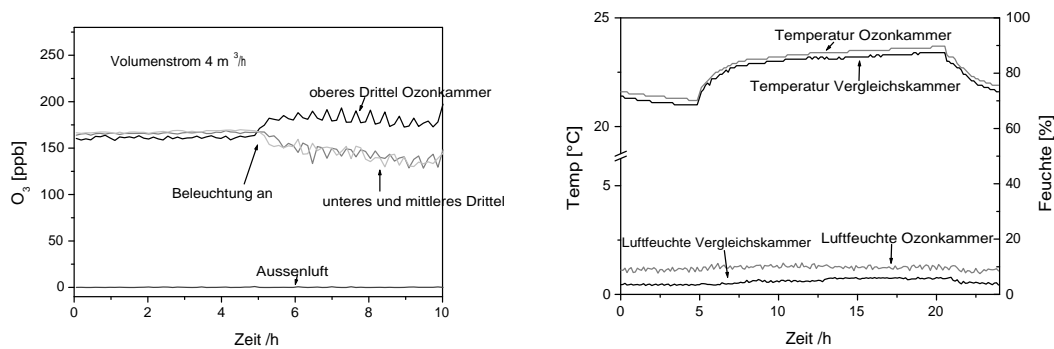


Abbildung 3.4: Lichtmenge in Abhängigkeit von der Höhe der Klimakammer

### 3.1.2.2 Verteilungsversuche

In den leeren Kammern werden zunächst Versuche zum Anfahr- und Durchmischungsverhalten durchgeführt. Um die Ozonverteilung über die Höhe zu bestimmen, wurden im Zuluftstrom, in der Mitte der Kammer (85 cm) und 20 cm über dem Boden je eine Messstelle eingerichtet und Ozon gemessen. Nach etwa 30 Minuten ist die Ozonkonzentration konstant. Die „Spitzen“, die in der Zuluft auftreten, hängen mit Schwankungen in der Druckluftversorgung zusammen. Sie verschwinden in der Kammer aufgrund der Konvektion.



(a) Verlauf der Ozonwerte

(b) Temperatur und Feuchte

**Abbildung 3.5:** Ozonwerte, Temperatur und Luftfeuchte in leeren Begasungskammern

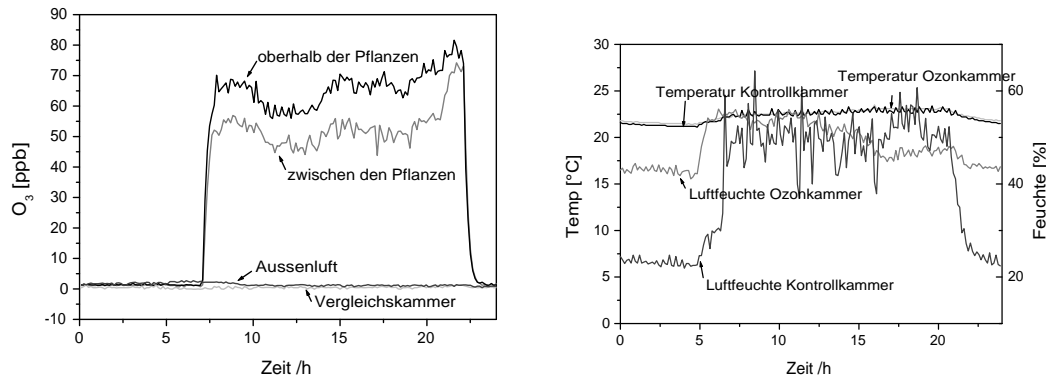
Das Einschalten der Lampen führt zu einem Ozongradienten. Im oberen Drittel liegt der Wert je nach Ausgangswert 30-50 ppb höher als im Rest der Kammer, vermutlich durch eine leichte Aufheizung der oberen Luftschicht. Obwohl der Wärmeeintrag der Neonröhren nur wenige Watt beträgt, reicht er offenbar aus, um die Durchmischung zu behindern [Abb. 3.5]. Graspflanzen erreichen das obere Drittel der Kammern nicht, daher kann die dortige schlechte Durchmischung vernachlässigt werden.

Um die horizontale Vermischung zu überprüfen, werden in 40 cm Höhe über dem Boden Messstellen angebracht, in der Mitte der Kammern und am Rand. Nach wenigen Minuten liegen identische Ozonkonzentrationen vor.

Bei den Durchmischungsversuchen muss die Trägheit des Messsystems berücksichtigt werden. Es dauert etwa 3 Minuten, bis ein aktueller Ozonwert vorliegt, so dass über kleinere Zeitintervalle keine Aussage getroffen werden kann.

Befinden sich Pflanzen in den Kammern, so sind die Strömungsverhältnisse völlig anders. Bei einjährigem Weidelgras, das etwa 30 cm hoch wird, gibt es nur geringe Einflüsse auf die Durchmischung. Wenn man zwischen den

Pflanzen Ozonwerte ermittelt, liegen die Konzentrationen um 20 ppb niedriger als oberhalb der Pflanzenschicht.



(a) Verlauf der Ozonwerte mit Bepflanzung

(b) Temperatur und Feuchte

**Abbildung 3.6:** Typische Ozonwerte, Temperatur und Luftfeuchte in Begasungskammern mit Bepflanzung im Tagesverlauf

Bei hohen Gräsern (bis 80 cm) muss zusätzlich ein Ventilator eingesetzt werden, um den Ozonwert über die Grundfläche der Kammer konstant zu halten. In der Höhe besteht immer noch ein Ozongradient [Abb. 3.6]. Die Blüten sind etwa 10 cm höher als der Pflanzenkörper und wachsen ständig, so dass es schwierig zu beurteilen ist, welcher Ozonwert für eventuelle Schäden ausschlaggebend ist. In den Kammern in Essen wird der Ozonwert weit oberhalb der Gräser bestimmt, so dass auch hier der Ozonwert über den Pflanzen angegeben wird.

Die Temperaturen in Ozon- und Vergleichskammer sind fast über den ganzen Tag identisch. Durch die Lampen bedingt gibt es einen Unterschied von 1,5 °C zwischen Nacht- und Mittagstemperatur. Die Luftfeuchte, die in leeren Kammern etwa 10 % beträgt [Abb. 3.5], steigt durch die Verdunstung der Pflanzen an. Während des Tages werden so je nach Luftdurchsatz und Größe der Pflanzen bis zu 60 % Luftfeuchte erreicht [Abb. 3.6].

In den Ozonkammern sind Licht- und Temperaturverhältnisse reproduzierbar, und es können über das ganze Jahr Pollen erzeugt werden.

## 3.2 Biochemische Analytik

### 3.2.1 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Der ELISA beruht auf dem Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen ein Antigen und deren selektive Bindungseigenschaften. In der einfachsten Form wird das interessierende Antigen an eine Festphase (üblicherweise eine Mikrotiterplatte mit hoher Proteinbindungskapazität) gekoppelt. Ein enzymmarkierter Antikörper bindet selektiv an das Antigen. Nachdem in einem Waschschriff nicht gebundene Antikörper entfernt wurden, kann über eine Farbreaktion das Antigen quantifiziert werden [16].

Es existieren zahlreiche Varianten des ELISA. Hier kommt der sogenannte Sandwich-ELISA zum Einsatz. Dafür werden zwei Antikörper benötigt, die gegen verschiedene Epitope des Antigens gerichtet sind. Der eine Antikörper wird als Fangantikörper an die Festphase gekoppelt und bindet das Antigen aus der im nächsten Schritt zugegebenen Probe. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym markiert. Er bindet an das Antigen. Der Nachweis erfolgt durch ein Substrat, das, wenn es vom Enzym umgesetzt wird, einen Farbumschlag zeigt. Eine Standardreihe bekannter Konzentrationen dient zur Kalibrierung. Durch diese Anordnung lässt sich die Genauigkeit gegenüber dem einfachen ELISA stark verbessern [15]. Man erhält eine Kurve der optischen Dichte abhängig von der Konzentration ähnlich Abbildung 3.7. Zur Auswertung können nur Proben herangezogen werden, die im linearen Bereich der Kurve liegen, da nur dort geringe Konzentrationsänderungen genügend starke Veränderungen der optischen Dichte bewirken.

Verwendet man statt direkt enzymmarkierter Antikörper das Biotin-Avidin-System, wird die Sensitivität des Assays erhöht. Biotin, auch bekannt als Vitamin H, hat eine besondere Affinität zu Avidin (Affinitätskonstante  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ), vier Biotinmoleküle können an jedes Avidin binden. Durch kovalente Bindung mehrerer Biotinmoleküle an den Detektionsantikörper kann das Signal amplifiziert werden [110]. Avidin wird heute in den meisten Fällen durch Streptavidin, ein Produkt des Pilzes *Streptomyces avidinii*, ersetzt. Es hat ähnliche Eigenschaften wie Avidin, neigt als Glykoprotein aber weniger zu unspezifischen Bindungen, und sein pH-Wert ist annähernd neutral [111]. Am Streptavidin ist Meerrettichperoxidase (POD) gebunden. POD ist eins der am häufigsten eingesetzten Detektionsenzyme im ELISA. Es bildet aus dem Substrat o-Phenylendiamin (OPD) einen gelben Farbstoff, der beim Abstoppen der Reaktion mit Säure in orange umschlägt und bei 492 nm vermessen wird.

Für Graspollenallergen steht ein ELISA für Phl p 5, das Gruppe 5-Allergen von *Phleum pratense* zur Verfügung. Aufgrund der Kreuzreaktivität zwischen den Gruppe 5-Allergenen der Gräser wird auch Lol p 5 erkannt. Zur Erstellung der Standardkurve wird ein definierter Extrakt von *Phleum pratense*-Pollen verwendet.

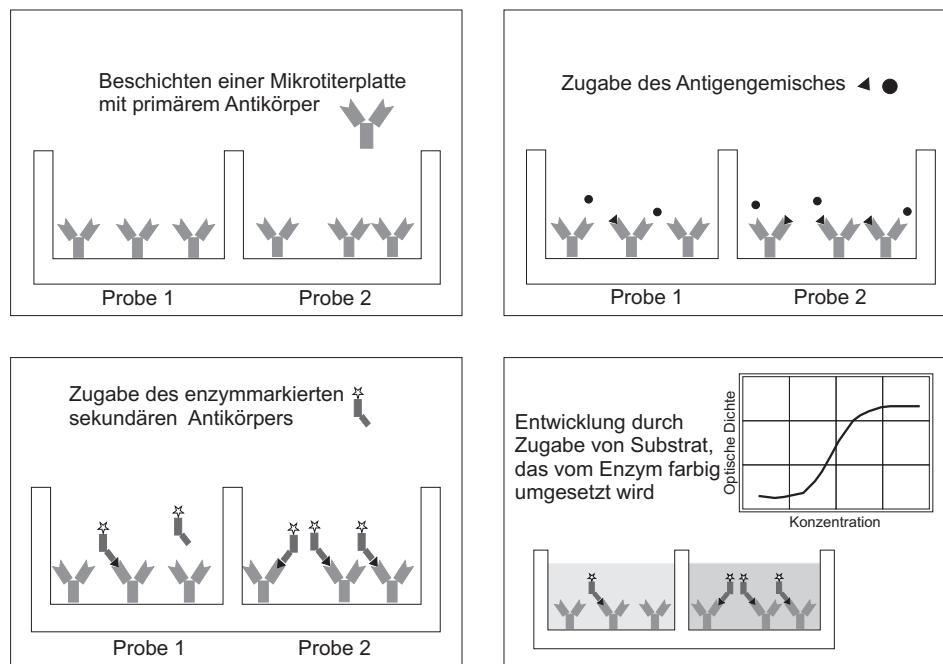


Abbildung 3.7: Schema eines Sandwich-ELISA

### 3.2.2 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Lösung ist ein entscheidender Schritt zur Charakterisierung eines Allergenextraktes, da er als Bezugsgröße für weitere Analysen wie ELISA und SDS-Elektrophorese dient. Zur Gesamtproteinbestimmung gibt es zahlreiche Methoden. Die wichtigsten sind die Proteinbestimmung nach Bradford und nach Lowry.

#### 3.2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford [112]

Der Bradford-Test beruht auf der Reaktion des sauren Farbstoffs Coomassieblau mit Arginin und anderen basischen und aromatischen Aminosäuren in Proteinen. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 465 nm (braun) nach 595 nm (blau). Durch Vergleich mit einer Kalibrierkurve (meist Rinderserumalbumin, BSA) wird der Proteingehalt der Probe bestimmt. Ungenauigkeiten treten durch verschiedene Zusammensetzung von Standard- und Probenprotein auf. Bei unterschiedlichem Gehalt an basischen und aromatischen Aminosäuren werden unterschiedliche Farbstoffmengen gebunden. Beim Bradford-Assay werden nur Proteine mit Molmassen größer 3-5 kD erfasst.

### 3.2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry [113]

Die Lowry-Methode ist ebenfalls ein colorimetrischer Test. Er beruht auf der Komplexbildung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch die Peptidbindung. Dieser Komplex unterstützt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat aus dem Folin-Ciocalteu-Phenol Reagenz durch Tryptophan und Tyrosin. Dabei findet vermutlich eine Reduktion des  $\text{Cu}^{2+}$  aus dem Kupfer-Protein-Komplex zu  $\text{Cu}^+$  statt. Die charakteristisch blaue Farbe entsteht durch Abspaltung von ein bis drei Sauerstoffatomen von Folin's Reagenz. Der Farbumschlag wird bei 650 nm vermessen.

Vor allem der Anteil an Tyrosin, Tryptophan, Cystein und Histidin bestimmt die Stärke der Farbentwicklung. Der Lowrytest ist sehr stör anfällig, zahlreiche in der Proteinchemie häufig verwendete Reagenzien beeinträchtigen die Genauigkeit. Durch verschiedene Modifikationen wurde aus dem Lowry-Test ein Mikroassay entwickelt, der stabiler und genauer ist [114].

Können Beeinträchtigungen des Assays ausgeschlossen werden und sieht man von einigen Ausnahmen ab, können bei verschiedenen Bestimmungsmethoden für das gleiche Protein immer noch Abweichungen zwischen 5 und 20 % auftreten. Bei Rohproteinlösungen sind die Unterschiede noch grösser. Daher ist die Angabe der Testmethode, die zu einem Ergebnis geführt hat, sehr wichtig.

### 3.2.3 Elektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung von geladenen Teilchen in einem homogenen elektrischen Feld. Das ursprüngliche Verfahren wurde von Tiselius in den 30er Jahren entwickelt. Er trennte Seren in einem mit Puffer gefüllten U-Rohr und wies so zum ersten Mal nach, dass Proteine Makromoleküle mit definierter Grösse, Ladung und Form sind. Darauf aufbauend wurden verschiedene Verfahren etabliert, die heute in der Bioanalytik, der Molekularbiologie und der forensischen Medizin Anwendung finden.

Wichtigste Weiterentwicklung ist die Elektrophorese in porösen Medien wie Agarosegel (Hjerten 1961) und Polyacrylamid (PA) (Raymond und Weintraub 1959). Durch die Porenstruktur der Gele werden die Teilchen abhängig von der Grösse retardiert, so dass eine Trennung nach Masse-Ladungs-Verhältnis erfolgt. Agarosegele werden vor allem in der Immunelektrophorese (Rocket-E.) und zur Trennung von DNA-Fragmenten eingesetzt. In der Proteinanalytik haben sich PA-Gele durchgesetzt, sie sind stabiler als Agarosegele, inert und transparent. Durch Variation von PA-Konzentration und Vernetzungsgrad kann die Porengrösse eingestellt werden, um verschiedene Trennprobleme zu optimieren.

Proteine als amphotere Substanzen werden bei der Elektrophorese nach ihrem effektiven Radius und der Ladung getrennt. Je nach eingesetztem Puffersystem variieren die Ladungen und es kann sein, dass basische Proteine aus dem Gel her-

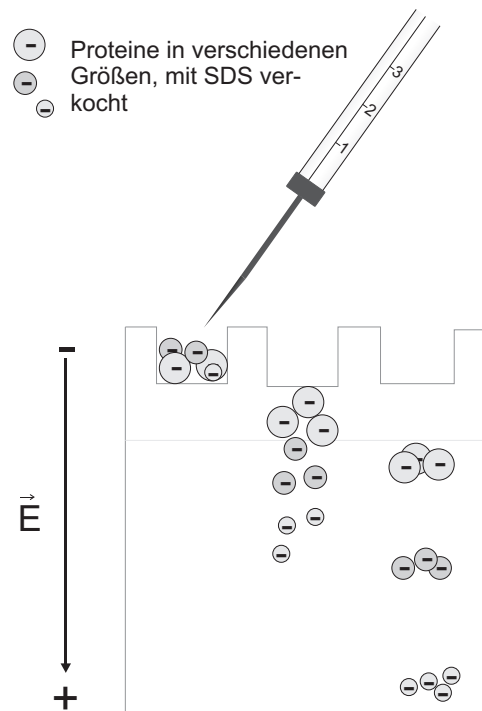


Abbildung 3.8: Schema einer SDS-Gelelektrophorese

auswandern und nicht erfasst werden. Zur Molmassenbestimmung von Proteinen müssen die Ladungen der Proteine „überdeckt“ werden. Das passiert durch Kochen mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS). Ein Gramm Protein bindet ca. 2,4 g SDS. Es entstehen Micellen mit negativer Ladung, die zur Anode wandern. Bei der SDS-Elektrophorese nach Laemmli mit einem Puffersystem aus HCl/Tris und Glycin lässt sich über einen weiten Bereich eine lineare Beziehung zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Molmasse der Proteine erhalten.

Eine moderne Variante der Elektrophorese ist die Kapillarelektrophorese (CE). Sie findet trägerfrei in Kapillaren mit Innendurchmessern um die  $100 \mu\text{m}$  statt. Als Trennmedien werden wässrige Puffersysteme eingesetzt. Die Detektion erfolgt üblicherweise durch UV-Absorption, Fluoreszenz oder auf elektrochemischem Weg [16].

### 3.2.4 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese beruht auf demselben Prinzip wie die trägerfreie Elektrophorese im offenen Rohr. Seit Anfang der achtziger Jahre sind zuverlässige und automatisierte Geräte erhältlich, so dass die CE zunehmend in der Routineana-



lytik eingesetzt wird. Wichtig hierfür war die Entwicklung von Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  und weniger. Durch das kleine Oberfläche-zu-Durchmesser-Verhältnis gibt es wenig Konvention und die gute Wärmeabfuhr ermöglicht das Anlegen hoher Spannungen. Die Kapillare wird mit einem wässrigen Puffer gefüllt, der den pH-Wert über die Trennstrecke konstant hält und den Ladungstransport gewährleistet. Im sauren pH-Bereich werden häufig Citrat- oder Phosphatpuffer eingesetzt, im basischen Borat oder Tris. Es kommen auch zwitterionische Puffersubstanzen wie MOPS, MES oder CAPS zum Einsatz [16].

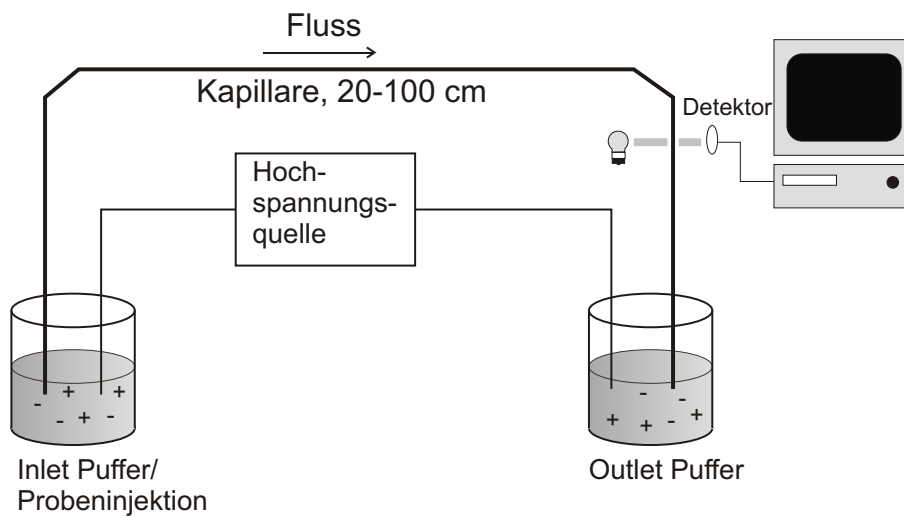
#### 3.2.4.1 Aufbau der CE

Grundbestandteile der CE sind die Kapillare, Detektor, Spannungsquelle, zwei Elektroden und Puffervials. An modernen Geräten sind üblicherweise auch ein Fraktionssammler, automatischer Probenaufgeber und eine Möglichkeit zur Temperierung der Kapillare vorhanden [Abb. 3.9].

Die Spannungsquelle in der CE kann entweder mit konstantem Strom oder mit konstanter Spannung betrieben werden. Dabei werden Spannungen bis zu 30 kV und Stromstärken um die 100 mA verwendet. Höhere Spannungen können zu Problemen durch Entladung am Gehäuse oder durch Luftfeuchte führen. Die Spannungsrichtung kann umgekehrt werden, da je nach Anwendung Detektion an der Kathoden- oder Anodenseite notwendig ist.

Als Kapillarmaterial wird üblicherweise amorpher Quarz (fused silica) eingesetzt. Er ist UV-transparent zur Detektion und chemisch stabil über einen weiten pH-Bereich. Der Innendurchmesser einer Kapillare liegt bei 50-100  $\mu\text{m}$ , der Außendurchmesser bei ca 350  $\mu\text{m}$ . Daher wird die Oberfläche der Kapillare mit einer Polyimidschicht geschützt und stabilisiert. Am Detektorfenster muss diese Schicht entfernt werden.

Um keine Bandenverbreiterung zu erzeugen, dürfen nur geringe Probenvolumina (einige Nanoliter) mit hoher Reproduzierbarkeit aufgegeben werden. Dies kann elektrokinetisch oder hydrodynamisch (durch Druck auf der Eingangsseite oder Vakuum auf der Detektorseite) geschehen. Die Druckinjektion ist heute am gebräuchlichsten, wobei Standardabweichungen von etwa 1 % bei der Probemenge erzielt werden. Bei der elektrokinetischen Injektion wird die Probe durch Anlegen einer Hochspannung elektrophoretisch und -osmotisch in die Kapillare transportiert. Die Probemenge ist dabei abhängig von der Mobilität ihrer Ionen. Technisch ist das leicht zu realisieren und bei gleicher Probe gut reproduzierbar, bei unterschiedlichen Matrices aber nicht sinnvoll, da Unterschiede in der Probenmenge um den Faktor 100 auftreten können. Bei gelgefüllten Kapillaren ist hydrodynamische Injektion nicht möglich, daher wird hier die elektrokinetische angewendet. Zur Detektion werden je nach Anwendung verschiedenste Methoden eingesetzt, vor allem UV-Absorption, Diodenarray, Fluoreszenz- oder Leitfähigkeitsmessung oder elektrochemische Detektion.



**Abbildung 3.9:** Aufbau einer Kapillarelektrophorese

### 3.2.4.2 Verfahren

Legt man an eine mit Puffer gefüllte Kapillare eine Hochspannung an, wandern die Kationen am Detektor vorbei zur Kathode. Aber auch Neutralteilchen und Anionen können in der CE aufgrund des elektroosmotischen Flusses (EOF) erfasst werden. Die Silanolgruppen auf der inneren Kapillarwand sind je nach pH-Wert negativ geladen und ziehen Kationen aus dem Puffer an. Es bildet sich eine Ionenschicht, deren positive Ladungsdichte mit der Entfernung von der Wand exponentiell abnimmt. Diese innere Helmholtz- oder Stern-Layer ist praktisch statisch. Weiter entfernt von der Wand liegt die outer Helmholtz Plane (OPL), eine diffuse Ionenschicht. Ionen aus der OPL wandern zur Kathode und ziehen durch ihre Hydrathülle Wassermoleküle mit sich. Aufgrund der Kohäsionskräfte des Wassers bewegt sich der gesamte Puffer in Richtung Kathode und ermöglicht auch die Detektion von neutralen und negativ geladenen Teilchen. Der EOF trägt nicht zur Peakverbreiterung bei wie die Strömung in der HPLC, da praktisch ein plug-flow angenommen werden kann.

### 3.2.4.3 CE von Proteinen

Nach der Theorie von Debye-Hückel hängt die Mobilität  $\mu$  von Teilchen von ihrer Ladung  $q$ , dem Stokesschen Radius  $r$  und der Viskosität  $h$  des Umgebungsmediums ab [115].

Bei Proteinen werden  $r$  und  $q$  von der dreidimensionalen Struktur der Moleküle bestimmt. Sie ist schwer vorherzusagen und ändert sich durch An- und Abwesenheit von Co-Faktoren und mit der chemischen und physikalischen Umgebung. Ein weiteres Problem sind Wechselwirkungen mit den Wänden der Kapillare. Bei Kapillaren aus fused silica beschreibt Gleichung 3.1 die Deprotonierung der Silanolgruppen:



Der pK-Wert dieser Reaktion liegt zwischen 4,5 und 5. Bei pH-Werten unterhalb von 4 sind die Silanolgruppen protoniert, es gibt keine elektrostatische Adhäsion der Proteine, wohl aber hydrophobe Adsorption, die zu Anlagerung an der Oberfläche führt. Zwischen pH 4 und 8 variiert der EOF stark und damit der Einfluss auf die Migrationszeit der Proteine. Deshalb arbeitet man bevorzugt unterhalb von 4 oder oberhalb des pI-Wertes der Proteine, so dass alle anionisch/neutral vorliegen.

Versuche, Allergene mittels CE zu trennen und zu analysieren wurden vor allem von Pacakova (Biene, Gras) [116], Besler (Hühnerei) [117] und Chen (Latex) [118] unternommen. Problematisch ist das Fehlen kommerziell erhältlicher gereinigter Pollenallergene als Vergleichsubstanzen.

### 3.2.5 Proteinfärbung in Gelen

Nach der Elektrophorese müssen Proteine durch unspezifische Färbung im Gel sichtbar gemacht werden. Hierfür gibt es zwei Standardmethoden, die Imprägnierung mit metallischem Silber (Silberfärbung) und die Färbung mit organischen Farbstoffen, vor allem Coomassie-Blau. Für die Silberimprägnierung gibt es verschiedene Methoden, zum Beispiel von Oakley (1980) mit ammoniakalischer Silberlösung, die Silbernitratfärbung von Merril et al. (1981) oder nach Blum et al. (1987). Die Silberfärbung bietet die größte Empfindlichkeit von allen Methoden, das Gel kann aber anschließend nicht für Blots o.ä. weiterverwendet werden. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit problematisch, da die erhaltene Farbtintensität stark von der Einwirkzeit abhängt [110].

Bei der konventionellen Coomassiefärbung mit Coomassieblau R250 bindet der Triphenylmethanfarbstoff im sauren Medium vor allem durch elektrostatische Wechselwirkungen an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Die Farbtintensität korreliert mit dem Gehalt an Lysin-, Arginin- und Histidinresten. Die Färbung erfolgt direkt in der Fixierlösung, Hintergrundfärbung wird durch anschließendes Waschen entfernt. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0.3-1  $\mu\text{g}/\text{Bande}$ .

Bei der kolloidalen Coomassiefärbung wird Coomassieblau G250, eine methylsubstituierte Form von R250 mit reduzierter Löslichkeit im sauren Medium, verwendet. G 250 kann als kolloidale Lösung auf das Gel aufgebracht werden. Der gelöste

Anteil färbt die Proteine, die Hauptmasse dringt aber nicht ins Gel ein, so dass praktisch keine Hintergrundfärbung entsteht. Somit ist kein Auswaschen mehr nötig. Außerdem ist die Empfindlichkeit der Methode deutlich höher als die der ursprünglichen Coomassiefärbung, das Gel ist für nachfolgende densitometrische Auswertung geeignet und kann auch geblottet werden. Man muss beachten, dass das Gel nicht dicker als 1 mm ist, die Proben gut vorbereitet sind und vollständig ins Gel einwandern. Das Gel darf nicht überladen werden und sollte lange genug (über Nacht) im Färbebad bleiben, um eine gleichmäßige Färbung zu erzielen.

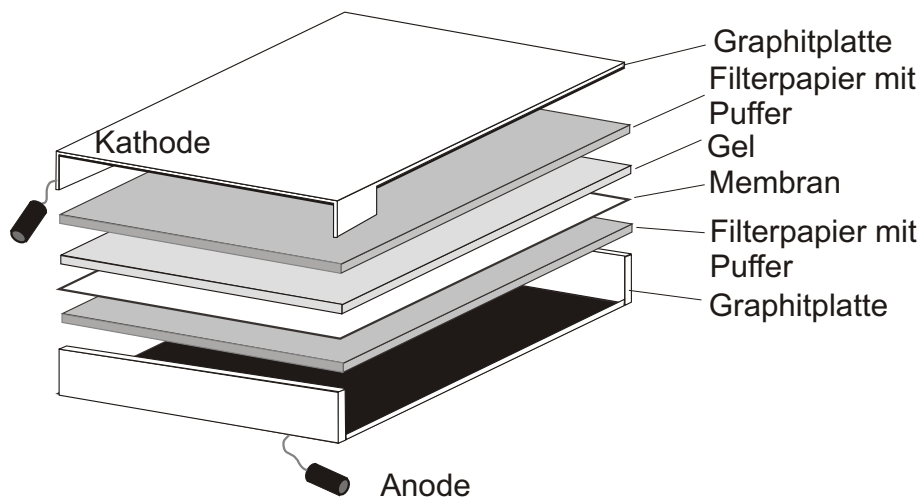
### 3.2.6 Blotting

Die Fixierung von Proteinen auf Membranen zur anschließenden Immundetektion, Massenspektrometrie oder Aminosäureanalyse wird als "Blotting" (auftropfen) bezeichnet. Im einfachsten Fall, dem Dot-Blotting, wird eine Proteinlösung auf eine Membran aus PVDF (Polyvinylidendifluorid) oder Nitrocellulose aufgetropft. Die Proteine haften durch physikalische Wechselwirkungen. Man benötigt je nach Eiweißkonzentration zwischen 0,2 und 10  $\mu\text{l}$  Lösung. Die Membran wird anschließend mit BSA oder Magermilchpulver geblockt, um unspezifische Bindung an freien Bindungsstellen der Membran zu verhindern. Im nächsten Schritt reagieren die immobilisierten Antigene mit einem spezifischen Antikörper, der mit einem enzymmarkierten Detektionsantikörper über eine Farbreaktion (ähnlich dem ELISA-Prinzip) sichtbar gemacht wird. Auf diese Weise kann schnell getestet werden, ob eine Lösung ein bestimmtes Antigen enthält oder es kann die Reinheit eines Antigens überprüft werden. Voraussetzung ist das Vorhandensein spezifischer Antikörper.

Nach einer Elektrophorese ist es möglich, Proteine zur weiteren Untersuchung aus dem Gel zu eluieren. Oft entstehen dabei Probleme durch zu geringe Proteinkonzentration, Verunreinigungen durch Gelbruchstücke oder zu große Mengen Salze oder Detergenzien; große oder sehr hydrophobe Proteine eluieren schlecht.

Deshalb entwickelten Renart und Tombin (1979) [119] eine Methode zur direkten Übertragung aus dem Gel auf eine Membran mittels elektrischer Spannung, wobei das Proteinmuster des SDS-PAGE-Gels erhalten bleibt. Dieser „Western-blot“ wird heute in verschiedenen Varianten durchgeführt. Die bekanntesten sind Tank- und Semidry-Blot. Beim Tankblot wird ein vertikaler Puffertank verwendet, in dem die Elektroden in gegenüberliegenden Wänden angebracht sind. Gel und Membran sind zwischen Filterpapieren in einer Kassette eingeklemmt. Bei konstantem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran. Der Strom steigt dabei von 500 mA am Anfang stetig an, so dass zur Kühlung größere Mengen an Puffer (ca. 2 l) nötig sind [16].

Beim Semidry-Blot liegen Gel und Membran zwischen puffergetränkten Filterpapieren horizontal zwischen den Elektrodenplatten [Abb. 3.10]. Es wird weniger Strom angelegt (ca. 1 mA/cm<sup>2</sup>), der während des Blots ansteigt. Gasentwicklung



**Abbildung 3.10:** Schematischer Aufbau des Blotsandwich beim Semidry-Verfahren

aus dem Wasser kann das Blotsandwich auseinanderdrücken, deshalb wird es mit einem Gewicht beschwert. Diese Variante hat sich immer mehr durchgesetzt, da sie sparsamer im Pufferverbrauch ist und die Proteine mehr an der Oberfläche der Membran bleiben, wo sie leichter detektiert werden können.

Bei beiden Methoden entstehen Probleme bei sehr großen Proteinen, die das Gel schlecht verlassen. Zu hohe Spannungen können dazu führen, dass kleine Proteine die Membran durchschlagen und der Detektion verlorengehen.

### 3.2.7 FTIR-Spektroskopie

Schwingungsspektroskopie wird in den verschiedensten Bereichen biochemischer Analytik (Lebensmittelanalytik, Medizin oder Mikrobiologie) und zur Klärung unterschiedlichster Fragestellungen eingesetzt. Bedeutend für die Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten gerade der IR-Spektroskopie war die Entwicklung der Fourier-Transformations-Infrarot Spektroskopie in der Mitte der 80er Jahre. Der Aufbau eines FT-IR ist in der Literatur beschrieben [120]. Grundsätzlich wird dabei das gesamte Interferogramm über einen Wellenzahlenbereich erfasst und anschließend mittels Fourier-Transformation in ein Spektrum überführt. Vorteile gegenüber der konventionellen IR-Technik ist eine bessere Ausnutzung der Lichtintensität und damit ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Spektren können schneller (ca. 1 Minute, je nach Auflösung) und mit großer Empfindlichkeit bei hoher Wellenzahlpräzision aufgenommen werden.

Bei Makromolekülen können nicht wie üblich Normalschwingungen ausgewer-

tet werden, sondern es werden Gruppenschwingungen betrachtet. Das heißt, ein Molekül wird in einzelne Gruppen und Bindungen zerlegt, die in erster Näherung unabhängig voneinander schwingen. Gerade die IR-Spektren von Proteinen sind gut erforscht und können zu Vorhersagen der Sekundärstruktur herangezogen werden. Verschiedene Banden konnten den Schwingungen des Peptidgerüsts oder den Seitenketten zugeordnet werden. Miyazawa et al. [121] erforschten ab 1958 an N-Methylacetamid die Schwingungsmoden des Peptidrückgrates, die sogenannten Amidbanden. Wichtig für Strukturvorhersagen ist dabei vor allem die Amid 1-Bande, die aus C=O-Streck-, C-N-Streck-, und C-C-N-Deformationsschwingungen besteht. Die genauen Werte der Wellenzahlen sind von der Umgebung der Proteine, vor allem von der Ausbildung von Wasserstoffbrücken abhängig. Gerade in Gemischen, wie sie typischerweise bei biologischen Proben vorliegen, ist die Auswertung einzelner Banden durch starke Überlagerungen problematisch. Man kann aber Regionen einteilen, in denen bestimmte Absorptionsbanden liegen. Tabelle 3.1 zeigt verschiedene Schwingungsmodi und ihre Wellenzahlen.

Da in komplexen biologischen Proben die Betrachtung von einer Bande oder

Wellenzahl [cm <sup>-1</sup> ]	Art der Schwingung
≈ 3500	-OH, Hydroxylgruppe
≈ 3200	NH-Streckschw. aus Protein (Amid A)
≈ 2959	CH-Str., assym. aus CH <sub>3</sub> Methylgruppen
≈ 2934	CH-Str. assym. aus CH <sub>2</sub> Methylengruppen
≈ 2921	CH-Str. aus Methylengruppen von Fettsäuren
2898	CH-Str. aus CH-Gruppen
2872	CH-Str. assym. aus Methylgruppen
2852	CH-Str. assym. aus Fettsäuren
1741	C=O aus Estergruppen
1715	C=O str. protonierter Carbonylgruppen, Carbonsäuren
1695, 1685, 1675	Amid 1, verschiedene Komponenten,
≈1655	Amid 1, α-Helix
~1637	Amid 1, β-Faltblatt
1550	Amid 2
1515	Schwingung von Tyrosinresten in Proteinen
≈1470	CH-Beugeschwingungen von CH <sub>2</sub>
≈1400	C=O symm. von Carbonsäureresten
1310-1240	Amid 3
1200-900	Ringschwingungen von Kohlehydraten
900-600	Fingerprint-Region

**Tabelle 3.1:** Typische IR-Absorptionsbanden [122]

Intensität nicht ausreicht, um die vorhandene Heterogenität zu erfassen, werden

statistische Methoden wie z.B. die Clusteranalyse angewandt, die im folgenden Kapitel dargestellt wird.

### 3.2.7.1 Clusteranalyse

Als Clusteranalysen bezeichnet man Klassifizierungsmethoden, um ausgehend von Distanzmatrizes die zu klassifizierenden Objekte in Klassen einzuteilen. Ähnliche Objekte werden dabei zusammengefasst, unähnliche weit voneinander getrennt. Man unterscheidet hierarchische und nichthierarchische Verfahren. Erstere können aufsteigend oder absteigend sein. Bevorzugt werden hierarchische Verfahren angewendet, da angenommen wird, sie beschreiben am besten die inhärenten hierarchische Struktur der Klasseneinteilung in einem Datensatz.

Der typische Algorithmus einer hierarchisch aufsteigenden Methode sieht wie folgt aus:

1. Anhand eines Ähnlichkeitsmaßes werden die zwei ähnlichsten Objekte zu einem Cluster zusammengefasst.
2. Die Abstände des neuen Clusters zu den restlichen Objekten wird bestimmt.
3. Wie in 1. werden die beiden ähnlichsten Objekte zusammengefasst.
4. Es folgt eine erneute Ähnlichkeitsberechnung usw.

So wird verfahren, bis alle Objekte in einem Cluster fusioniert sind [123]. Die

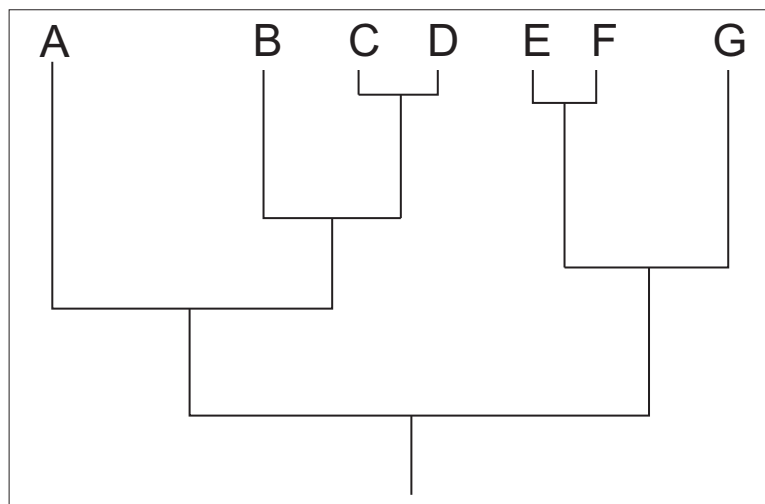


Abbildung 3.11: Beispiel eines Clusters

spektrale Distanz zweier Spektren  $y_1$  und  $y_2$  kann zum Beispiel über den Pearson'schen Produktmoment Korrelationskoeffizient  $r$  ausgedrückt werden.

$$r_{y_1, y_2} = \frac{(\sum_{i=1}^n y_{1,i} * y_{2,i}) - n y_1 * y_2}{\sqrt{(\sum_{i=1}^n y_{1,i}^2 - n y_1^2) * (\sum_{i=1}^n y_{2,i}^2 - n y_2^2)}} \quad (3.2)$$

$y_{1,i}, y_{2,i}$ : y-Werte der Spektren, z.B. Extinktionswerte bei Wellenzahl  $i$   
 $n$ : Anzahl der Datenpunkte

Aus  $r$  kann dann die spektrale Distanz  $d$  berechnet werden:

$$d_{y_1, y_2} = (1 - r_{y_1, y_2}) * 1000 \quad (3.3)$$

$r$  kann dabei Werte zwischen null (keine Ähnlichkeit), eins (identische Objekte) und minus 1 (vollständige negative Korrelation) annehmen. Alternativ können spektrale Abstände durch z.B. euklidische Distanzen im zweidimensionalen Faktorraum ausgedrückt werden. Verschiedene Clusteranalyseverfahren unterscheiden sich in der Berechnung dieser Distanzen. Bei „Average Linkage“ entsprechen die Fusionswerte im Dendrogramm in etwa den ursprünglichen Distanzen. Die Entfernung eines neuen Clusters zum Cluster  $i$  wird hier durch einen ungewichteten Mittelwert bestimmt:

$$d_{neu, i} = 1/2(d_{p_i} + d_{q_i}) \quad (3.4)$$

Beim Ward'schen Algorithmus ist ein „Zuwachs an Heterogenität“ ein Maß für den Abstand. Er wird über Quadratsummen gebildet, daher wachsen die Werte rasch an und sind von der Anzahl der Spektren abhängig. Die erhaltenen Werte kann man nicht mehr als Distanzen interpretieren.

Problematisch ist bei allen Verfahren, ob und inwieweit sie die Realität richtig wiedergeben. Der Cluster in Abbildung 3.11 wurde mit „Average Linkage“ erstellt. Auf den ersten Blick scheint A weit außerhalb der anderen „Spektren“ zu liegen, die Trennung zwischen den beiden Clustern erfolgt aber zwischen ABCD und EFG. Die Objekte D und E, obwohl sehr ähnlich, driften immer weiter auseinander. Deshalb prüft das Programm Opus intern, ob ganz am Anfang der Analyse zwei Spektren näher zusammenliegen als nach dem Zusammenschluss. Wenn sie noch nicht verbunden sind, gibt das Programm eine Warnmeldung aus [124].

Eine Entscheidung, welcher Algorithmus für welches Probenkollektiv am geeignetsten ist, kann nur durch Versuch und Irrtum getroffen werden. Bei komplexen biologischen Proben haben sich aber vor allem „Average Linkage“ und Wards Algorithmus bewährt.

### 3.2.8 Extraktion

In der Literatur werden zahlreiche Methoden zur Extraktion von Allergenen aus Pollen beschrieben. Dabei kommen verschiedene Extraktionspuffer wie Coca's



Lösung oder Ammoniumhydrogencarbonat zur Anwendung. Ebenso variieren das Verhältnis Pollen zu Puffer und die Dauer und Bedingungen der Extraktion. Wichtig sind milde Bedingungen, um die Strukturen der Allergene und die Epitope weitgehend zu erhalten, und zu vermeiden, dass sie von Proteasen abgebaut werden. Dazu sind 4 °C ausreichend - zumindest bei Pollenallergenen. Bei einfacher Hydratation wird der Großteil des IgE-bindenden Proteins schon nach den ersten 10 min in Lösung gehen [125]. Verwendet man Detergenzien, liegt mehr allergisch irrelevantes Protein im Extrakt vor. Maasch et al. untersuchten die Zeitabhängigkeit bei der Allergenextraktion [126]. Bereits nach 5 Minuten waren alle Allergene in Lösung nachweisbar, eines (Gruppe 2) war sogar schon vollständig extrahiert. Der Gehalt an Gruppe-1 stieg bis zu 13 Stunden an, ebenso wie der Proteingehalt, der noch 48 Stunden leicht ansteigt. Proteolytische Zersetzung konnte unter den gewählten Bedingungen (4 °C) nicht beobachtet werden. Die geeigneten Extraktionsbedingungen sind also ein Kompromiss aus schonender Behandlung der Proteine und vollständiger Gewinnung der Allergene.

### 3.3 Pflanzenmaterial

Weidelgras (*Lolium*) wird hier als Modellpflanze genutzt, da es eine große Bedeutung als Futterpflanze im gemäßigten Klima (Europa und Australien) hat und Sensibilisierung gegen Weidelgraspollen weit verbreitet ist. Die Pollen lassen sich aufgrund der schlanken Ähren und des großen Ertrags gut gewinnen. Die Allergene der Weidelgraspollen sind schon gut erforscht (siehe Kapitel 2) und Antikörper sind kommerziell erhältlich. Weidelgras kommt in drei Hauptarten vor, mehrjähriges (*Lolium perenne*, Deutsches Weidelgras), überjähriges (*Lolium multiflorum*, Welsches Weidelgras) und einjähriges Weidelgras (*Lolium westerwoldicum*).

#### 3.3.0.1 *Lolium perenne*

*Lolium perenne* ist ein ausdauerndes wintergrünes Horstgras, das vor allem im Seeklima gut gedeiht. Die Blütezeit beginnt im Mai bis Juni und zieht sich über den ganzen Sommer bis in den Herbst hinein. *Lolium perenne* kommt vor allem auf Grasland, Wegen, Rainen, Rasenflächen und Grasplätzen vor, da es sehr trittfest ist. Als wichtiges Futter- und Weidegras verträgt es Verbiss sehr gut und wächst rasch nach. Es ist in Nordamerika, Nordafrika und im gemäßigten Asien eingebürgert worden. Schädlich für *Lolium perenne* sind Frost, eine ausgedehnte Schneeperiode und Trockenheit.

*Lolium perenne* kommt nur nach dem Winter zur Blüte. Nach der Aussaat und einer gewissen Anwachszeit muss es einem künstlichen Winter (Vernalisation) ausgesetzt werden (ca. 7 °C für 6 Wochen), langsam wieder an Temperaturen um 20 °C gewöhnt werden und dann durch Lichtperioden länger als 16 Stunden pro Tag (Langtagpflanze) die Blüte induziert werden. Dies ist im Gewächshaus

problematisch, die Pflanzen erholen sich nach der Kälteperiode oftmals schlecht, die Vernalisation ist nicht erfolgreich oder die Pollenerträge sind gering, wenn überhaupt vorhanden.

### **3.3.0.2 *Lolium multiflorum***

*Lolium multiflorum* ist ein ein- bis mehrjähriges Horstgras, das bis zu 1 m hoch werden kann. Nach dem Schnitt wächst es schnell nach und schiebt neue Blüten. Es überwintert je nach Witterungsbedingungen ein oder mehrmals. Deshalb ist es nicht für Grasland geeignet. Zur Grünfuttergewinnung wird es häufig angebaut, da es hohe Erträge liefert.

Auch *Lolium multiflorum* muss vernalisiert werden, um zu blühen. Bei Entnahme aus dem Freiland nach dem Winter blüht es auch in den Begasungskammern bis zu zweimal und liefert große Pollenmengen. Allerdings kann es nur zwischen Mai und Juli verwendet werden, da dann die Blütezeit endet.

### **3.3.0.3 *Lolium westerwoldicum***

*Lolium westerwoldicum* ist von der Morphologie dem mehrjährigen Weidelgras sehr ähnlich. Es handelt sich um eine Unterart, allerdings überwintert es nicht. Es geht ohne Vernalisation von der vegetativen in die generative Phase über, so dass es sich zur Untersuchung gut eignet [127]. Etwa sechs Wochen nach der Aussaat blühen die Graspflanzen, abhängig von den Wetterbedingungen. Wachsen die Pflanzen im Freiland heran, werden sie größer und kräftiger als im Labor oder direkt in den Begasungskammern. Auch Schädlinge wie Blattläuse oder Mehltau verursachen dann weniger Probleme.

# Kapitel 4

## Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Protein- und Allergengehalt

Der Gehalt an Gruppe 5 Allergen im Pollenextrakt läßt sich über den ELISA sehr genau bestimmen (im Bereich ng/ml). Problematisch ist die Auswahl einer geeigneten Bezugsgröße. Die Ergebnisse der Gesamtproteinbestimmung sind weniger genau als die des ELISAs (siehe Kapitel 3) und können unter Umständen Trends in den Ergebnissen überdecken. Deshalb werden zum einen die Gruppe 5-Gehalte der Extrakte und auch das Verhältnis Gruppe 5 Allergen zum Gesamtprotein angegeben.

#### 4.1.1 Klimakammern Paderborn

In den Paderborner Klimakammern werden hauptsächlich *Lolium multiflorum* und *Lolium westerwoldicum* eingesetzt. *Lolium perenne* ist nur einmal verwendet worden, wobei nur eine Probe genommen werden konnte. Bei den ersten Versuchen wurden insgesamt nur wenig Pollen erhalten, so dass Sammelproben über mehrere Tage untersucht werden mußten. Bei Versuchen mit *Lolium multiflorum* und später auch mit *Lolium westerwoldicum* konnte jeden Tag eine ausreichende Menge Pollen zur Extraktion geerntet werden.

Das verwendete Begasungsprogramm war identisch bei allen Versuchsreihen (außer beim ersten Versuch). Die Pflanzen erhielten acht Stunden über Nacht kein Ozon, während der Lichtphase (sechzehn Stunden) wurde Ozon von 80 bzw. 140 ppb aufgegeben. In der Kontrollkammer blieben die Ozonwerte immer unterhalb der Erfassungsgrenze.

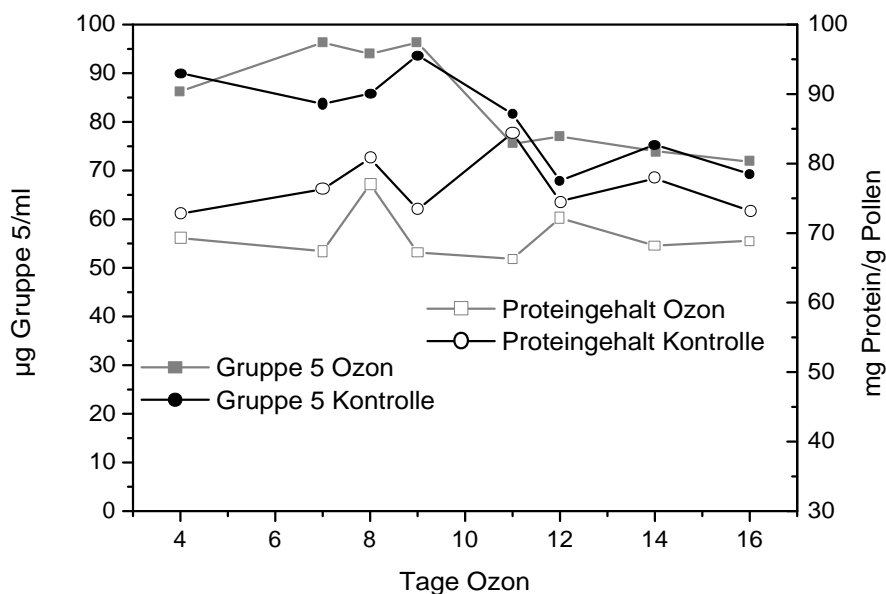
##### 4.1.1.1 *Lolium multiflorum*.

1. durchgehende Ozonbegasung über 24 Stunden  
Es konnten drei Proben genommen und untersucht werden. Im Allergen-

Proteinverhältnis wurde kein eindeutiger Trend festgestellt. Allerdings sind die Allergenwerte der ersten beiden Proben (Pollen vom 26.5. und vom 30.5.) außergewöhnlich niedrig und die Pollen selbst klumpig, so dass es nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie mit zu hoher Feuchtigkeit in Kontakt gekommen sind.

## 2. Tag-Nacht Programm

Die Gruppe 5-Gehalte der Extrakte von ozonisierten und Kontrollpollen sowie der Proteingehalt pro Gramm Pollen sind in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1:** *Lolium multiflorum*, Allergen- und Proteinwerte

Die Allergengehalte zeigen keine signifikanten Unterschiede. Im Proteingehalt liegen die Kontrollpollen teilweise deutlich höher als die ozonisierten. Dadurch ist das Verhältnis Gruppe 5 Allergen - zu - Masse - Protein bei den ozonisierten Pollen größer als bei der Kontrolle [Abb. 4.2].

Bei einer Wiederholung des Versuchs konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden, die Proteingehalte waren nicht signifikant verschieden. Auch im Allergen - zu - Proteinverhältnis zeigte sich kein Unterschied.

Bei allen Versuchen konnte sowohl bei der Kontrolle als auch bei den beagsten Pollen eine Abnahme der Gesamtproteinmenge als auch des Allergengehaltes über die Zeit beobachtet werden. Ob das ein Effekt ist, der vielleicht von den suboptimalen Lichtverhältnissen in den Kammern verursacht wird, oder ein zufälliger Verlauf, kann nicht beurteilt werden.

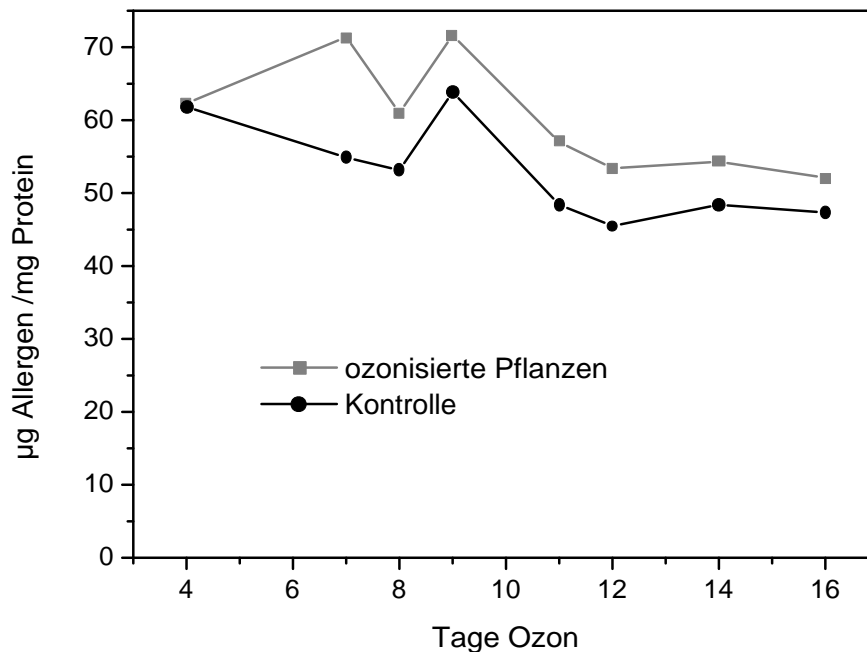


Abbildung 4.2: *Lolium multiflorum* Verhältnis Allergen zu Protein

#### 4.1.1.2 *Lolium westerwoldicum*

Die ersten Versuche mit *Lolium westerwoldicum* wurden mit einem Tag-Nacht-Programm (8h 0 ppb Ozon, 16 h 80 ppb) durchgeführt. Wie in Abb. 4.3 illustriert ist, ist das Verhältnis von Gruppe 5 Allergenen zu Protein bei den ozonisierten Pollen höher als bei der Kontrolle. Die Unterschiede sind allerdings gering. Auch der Gesamtproteingehalt ist bei den ozonisierten Pollen höher, ebenso die Menge an Gruppe 5-Allergenen im Extrakt.

Um den Effekt deutlicher sichtbar zu machen, wurden höhere Ozonwerte (um die 140 ppb tagsüber) eingesetzt. Bei den ersten beiden Proben (13.2.02 und 6.3.02) bestätigte sich dieser Effekt, bei den weiteren Proben nicht. Das kann an einer Gewöhnung der Pflanze an den Stressfaktor Ozon liegen oder an einer so schweren Schädigung durch Ozon, dass der Stoffwechsel der Pflanze zu stark verändert ist. Auch bei einem dritten Versuch über 20 Tage, bei dem jeden Tag eine Probe genommen wurde, ließ sich kein eindeutiger Effekt nachweisen.

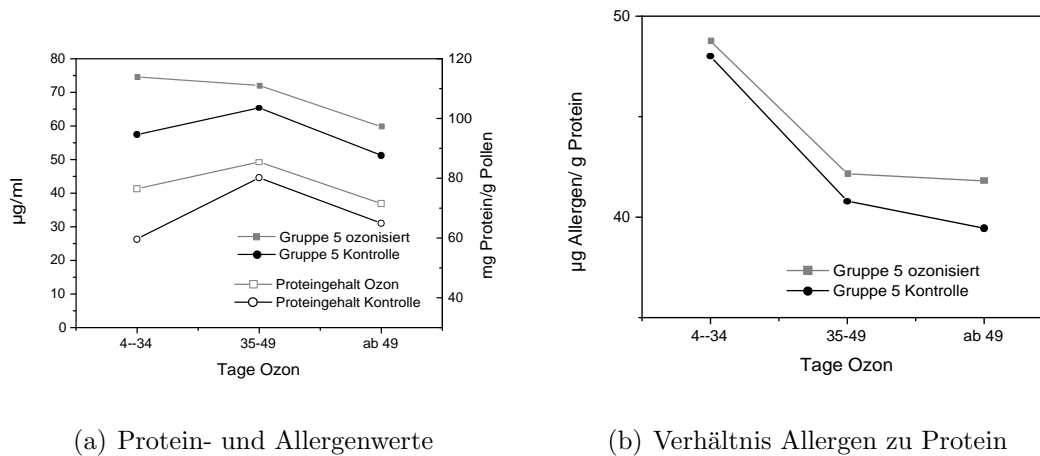


Abbildung 4.3: *Lolium multiflorum*, tagsüber 80 ppb, nachts 0 ppb Ozon

## 4.1.2 Klimakammern Essen

Im Jahr 2001 konnte *Lolium multiflorum* in Essen über mehrere Wochen in den Klimakammern begast werden. Dabei dienten zwei Kammern als Kontrolle (0 ppb Ozon). In zwei Kammern wurde ein „ländliches Ozonmuster“ (50-60 ppb über 24 h) aufgegeben und in zwei weiteren Kammern ein „städtisches Muster“ (nachts 40 ppb, tagsüber bis zu 100 ppb).

Die Protein- und Allergenwerte dieser Versuchsreihe sind recht einheitlich. Nur eine Probe bei Begasung mit „städtischem Muster“ liegt weit unterhalb des Durchschnittswertes. Es ist kein Trend oder Unterschied zwischen Kontrolle und ozonisierten Pollen zu erkennen.

## 4.1.3 Fazit

Bei mehreren Wiederholungen der Versuche konnte im ELISA keine signifikante Änderung des Gehalts an Gruppe 5-Allergen nachgewiesen werden.

Gruppe 5 ist nur eines der Majorallergene der Gräser. Um eine Aussage über die Allergenität eines Extraktes zu machen, müßten noch weitere Allergene bestimmt werden, wie zum Beispiel Gruppe 1. Dafür steht leider kein funktionierender ELISA zur Verfügung.

Die Menge an Lol p 5 im Extrakt hängt stark von der Grassorte, den Anzuchtbedingungen und Extraktionsbedingungen ab. Wählt man ein abweichendes Pollen-Pufferverhältnis – setzt man zum Beispiel mehr Puffer ein, wenn zu geringe Pollenmengen vorhanden sind – ist der Gruppe 5-Gehalt erhöht. Der Proteingehalt ist dann geringer, während bei dem üblichen Extraktionsverhältnis von 2 % w/v der Proteingehalt der Extrakte recht konstant ist.

Die Allergen- und Proteinwerte unterscheiden sich leicht, je nach *Lolium*-Art.

Art	Lol p 5 im Extrakt	Protein im Extrakt	Protein pro g Pollen	% Allergen vom Protein
<i>Lolium perenne</i>	40 $\mu\text{g/ml}$	1,65 mg/ml	ca. 80 mg	2,5
<i>Lolium multiflorum</i>	50-130 $\mu\text{g/ml}$	1,3-2 mg/ml	50-70 mg	5-6
<i>Lolium westerwoldicum</i>	80-120 $\mu\text{g/ml}$	1,4-2 mg/ml	75-105 mg	4-7

**Tabelle 4.1:** Durchschnittliche Protein- und Allergengehalte verschiedener *Lolium*-Arten

In *Lolium westerwoldicum* ist im Verhältnis am meisten Allergen enthalten, in *Lolium perenne* am wenigsten (Tabelle 4.1). Die hier untersuchten Pollen werden unter unnatürlichen Verhältnissen in den Klimakammern gesammelt. Zum Vergleich werden auch Pollen aus dem Freiland untersucht, z.B. von *Lolium multiflorum* Pflanzen, die aus der selben Aufzucht stammen wie die aus den Kammern und in den gleichen Töpfen heranwachsen, allerdings im Freiland unter natürlichen Lichtverhältnissen. Die Proteinwerte liegen bei etwa 65 mg pro g Pollen und die Menge an Lol p 5 im Extrakt bei 70  $\mu\text{g/ml}$ . Zusätzlich wurden Pollen von Loliumpflanzen im Freiland gesammelt. Allerdings liegen hier keine Informationen über die Sorte vor. Der Proteingehalt war mit 89-120 mg pro g Pollen wesentlich höher als unter Laborbedingungen, der Allergengehalt mit ca. 30  $\mu\text{g}$  pro mg Protein geringer.

Quantifizierung von Allergenen in Pollenextrakten wurde von z.B. Fahlbusch et al. [128] oder Schäppi et al. [129] vorgenommen. Da die Werte sehr von der Extraktionsmethode abhängen, ist ein Vergleich schwierig. Fahlbusch untersuchte den Gruppe 5- und Gruppe 1-Gehalt verschiedener Gräser, für *Lolium perenne* werden 38  $\mu\text{g}$  Gruppe 5 pro mg Protein gefunden, das sind ca. 4 % des Gesamtproteins. Bei einem Extraktionsverhältnis von 10 % w/v erhalten sie 2 mg/ml Protein im Extrakt, was in etwa den hier gefundenen Werten entspricht. Der Anteil an Gruppe 1 Allergen ist etwa doppelt so hoch wie der an Gruppe 5. Schäppi et al. verglichen *Lolium perenne* und *Lolium multiflorum* und finden einen Anteil von Gruppe 5 am Gesamtprotein von 18,2 % bzw von 28,2 %. Durch die abweichenden Extraktionsbedingungen erhalten sie einen Proteingehalt von 485 bzw 584  $\mu\text{g/ml}$ .

Obwohl man zwischen ozonbegasteten und nicht begasteten Pollen keinen signifikanten Unterschied im Allergengehalt nachweisen kann, ist es durchaus möglich, dass andere Majorallergene in verschiedenen Konzentrationen auftreten.

Das Fehlen einer absoluten Bezugsgröße für den Allergengehalt ist ein weiteres Problem. Wenn bei begasten Pollen (wie in Kapitel 2 vermutet), die Stärkeeinlagerung nicht oder nur eingeschränkt stattfindet, wären diese Pollen leichter und das Extraktionsverhältnis würde verfälscht. Da keine Möglichkeit besteht, die Pollen vor dem Einwiegen zu zählen und auf fehlende Stärkekörner zu untersuchen, kann das nicht ausgeschlossen werden.

Der Proteingehalt der Extrakte ist nicht unterschiedlich. Das kann an der mangelnden Sensitivität des Assays liegen. Dadurch werden eventuell vorhandene geringe Unterschiede im Proteingehalt nicht entdeckt. Trotzdem wird er hier als Bezugsgröße gewählt.



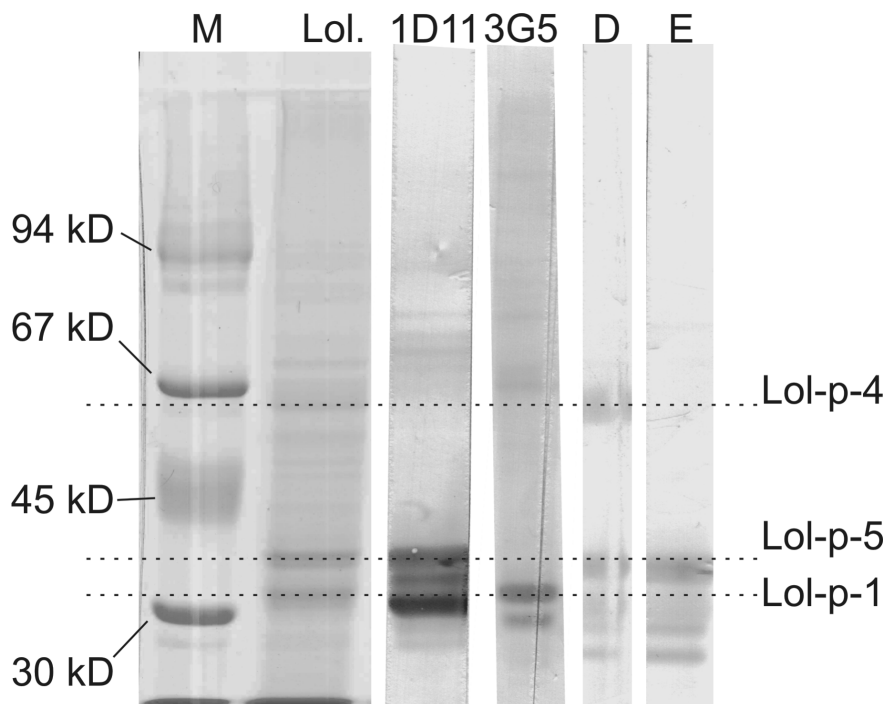
## 4.2 SDS-Gelelektrophorese und Blots

Da es sich bei Graspollenallergenen um Proteine handelt, können qualitative und eingeschränkt auch quantitative Veränderungen im Allergengehalt der Pollen über SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Durch Blot und Detektion mit Allergiker-Seren können Bindungseigenschaften der Allergene zu spezifischem IgE auf Modifikationen überprüft werden.

### 4.2.1 Nachweis der Allergene im Gel

Um zu überprüfen, welche der Banden im SDS-Gel allergene Wirkung haben, wird der Blot mit monoklonalen Antikörpern gegen Gruppe 1 und 5 und zwei Seren inkubiert. Zum Vergleich dient eine mit Ponceau-S gefärbte Bahn mit Pollenextrakt bzw. Molgewichtsmarkern [Abb. 4.4].

Der Pollenextrakt (Lane 2) zeigt viele scharfe Banden, die Proteine konnten



**Abbildung 4.4:** Identifizierung von Allergenen im Western-Blot, Lane 1: Marker; Lane 2: Lolium-Extrakt, Coomassiefärbung; Lane 3: mAbs gegen Gruppe 5; Lane 4: mAbs gegen Gruppe 1; Lanes 5 und 6: Allergikerseren; Gel 12%/4%, Tris-HCl-Glycin

sauber getrennt werden. Der monoklonale Antikörper (Lane 4) gegen Gruppe 1 bindet an eine Doppelbande bei ca. 30 kD. Laut Literatur zeigt Lol p 1 eine

einzelne Bande bei 31 kD. Die Abweichung kann durch Abspaltung eines Fragments (vielleicht des Kohlenhydratanteils) und dadurch bedingte Veränderung des Molekulargewichts zustandekommen. Das Epitop, gegen das der Antikörper gerichtet ist, bleibt aber intakt. Es ist auf der anderen Seite möglich, dass der verwendete Antikörper nicht genügend spezifisch ist und mit einem anderen Protein reagiert.

Der Antikörper gegen Gruppe 5 (Lane 3) erkennt eine Dreifachbande zwischen 30 und 36 kD, was sich in guter Übereinstimmung mit der Literatur befindet. Im gefärbten Gel ist die Unterscheidung zwischen den Banden von Lol p 1 und Lol p 5(a-c) schwierig, da sie sehr nah nebeneinander liegen. Was im Blot als intensive Bande herauskommt, ist in der Färbung möglicherweise nur eine dünne Bande von vielen, da die Immundetektion wesentlich empfindlicher ist.

Die Seren (Lanes 5 und 6) binden im Bereich um die 30 kD mehrere Proteine, sie enthalten spezifisches IgE gegen Gruppe 1 und 5. Serum D erkennt eine weitere Bande bei ca. 60 kD. Laut Literatur kann es sich hier um Lol p 4 handeln. Theoretisch ist ein Dimer von Gruppe 5 möglich, was in der Literatur beschrieben ist, aber ein solches sollte von den mAbs gegen Lol p 5 oder einem Serum mit Gruppe 5-spezifischem IgE erkannt werden. Bei Serum E ist keine Bande bei 60 kD zu erkennen.

Die schwachen Banden unterhalb von 30 kD und oberhalb von 60 kD können keinen Allergenen zugeordnet werden. Es kann sich hier auch um eine unspezifische Bindung handeln.

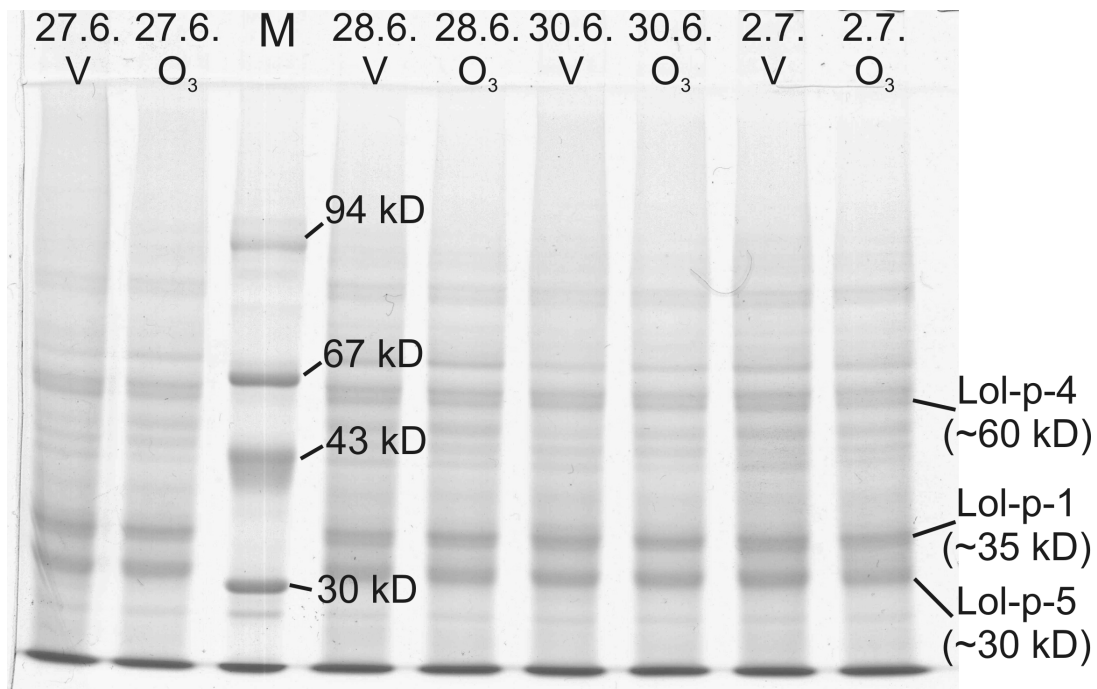
## 4.2.2 Vergleich ozonisierte und Kontrollextrakte

### 4.2.2.1 Bandenmuster

Zum Vergleich werden ozonisierte und Kontrollpollenextrakte im Gel nebeneinander aufgetragen und angefärbt [Abb. 4.5]. Die Extrakte stammen von *Lolium multiflorum*-Pflanzen, die zwischen 11 und 15 Tagen erhöhten Ozonwerten in den Klimakammern ausgesetzt waren.

Im Bandenmuster ist kein Unterschied zu erkennen. Die Hauptbanden liegen jeweils bei 31, 36, 55, 61, 70 und 85 kD. Bei den begasten Pollen sind keine zusätzlichen Banden aufgetreten, es gibt auch keine Bandenverschiebung, was ein Hinweis auf Veränderungen der Sequenz oder Struktur eines bestimmten Proteins ist. Auch in den Gelen der weiteren Versuchsextrakte waren keine Unterschiede zwischen begasten und Kontrollpflanzen zu erkennen. Die verschiedenen *Lolium*-Arten zeigen praktisch identische Bandenmuster, was auf die Ähnlichkeit der Extrakte hinweist.

Die Gele werden eingescannt und über die optische Dichte semiquantitativ ausgewertet. Dabei werden vor allem die Banden bei 30, 36 und 60 kD betrachtet. Wie in Tabelle 4.2 zu erkennen, gibt es keine signifikanten Unterschiede.



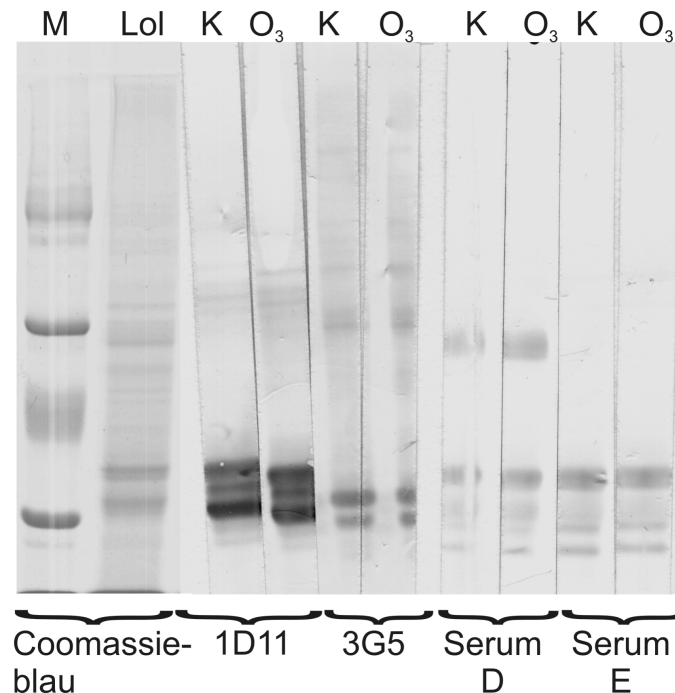
**Abbildung 4.5:** SDS-Page von ozonisierten ( $O_3$ ) und unbehandelten (V) Pollenextrakten, M: Pharmacia Low molecular weight marker, Gel 12%/4%, Tris-HCl-Glycin

Probe	36 kD (Gr1)	60 kD (Gr4)	30 kD (Gr 5)
Gel 1			
20.6. V	88,7	76,6	68,7
20.6. Oz	74,8	60,5	73,2
23.6. V	85,6	54,2	57,9
23.6. Oz	71,2	59,5	69,2
24.6. V	68,0	66,5	58,7
24.6. Oz	64,0	46,6	63,2
25.+26.6. V	76,1	46,6	52,7
25.+26.6. Oz	74,5	41,3	75,5
Gel 2			
27.6. V	92,4	59,3	59,8
27.6. Oz	101,0	79,8	81,8
28.6. V	90,0	76,6	64,1
28.6. Oz	85,4	76,0	70,6
30.6. V	91,2	60,3	65,1
30.6. Oz	103,0	64,2	77,8
2.7. V	109,0	84,8	77,1
2.7. Oz	104,8	77,6	72,6

**Tabelle 4.2:** Densitrisch bestimmte Bandenintensitäten - *Lolium multiflorum*, V: Vergleich, Oz: Ozon

#### 4.2.2.2 Bindung von spezifischem IgE im Blot

Um zu überprüfen, ob sich die Bindungseigenschaften der Proteine zu spezifischem IgE durch Ozon verändern, wurden Kontroll- und Ozonproben geelektrophoretisch getrennt, geblottet und mit Patientenseren detektiert [Abb. 4.6].



**Abbildung 4.6:** Detektion von begasten und Kontrollpollen mit Allergikerseren (Serum D und E) und mAbs (1D11 gegen Gruppe 5, 3G5 gegen Gruppe 1), K Kontrolle, Oz Ozon

Die Banden zeigen keine Unterschiede zwischen begasten und unbegasten Pollen. Änderungen können sich zum Beispiel durch Punktmutationen ergeben, die zum Austausch einer Aminosäure führen. Die daraus folgende leichte Differenz in der Molmasse ist im SDS-Gel nicht zu erkennen, kann aber zur Zerstörung eines Epitopes führen, so dass Antikörper das Protein nicht mehr erkennen. In Patientenseren liegen Mischungen von IgE vor, die gegen verschiedene Epitope eines einzigen Antigens gerichtet sein können, daher müssten schon mehrere Epitope verändert sein, damit es nicht mehr gebunden wird. Die verwendeten monoklonalen Antikörper, die alle gegen ein Epitop gerichtet sind, reagieren empfindlicher auf Veränderungen. Aber in den Lanes 3-6 sind auch keine Unterschiede zwischen Kontrollextrakt und ozonisiertem Pollen zu erkennen.

Der immunochemische Nachweis der Proteine ist empfindlicher als die unspezifische Färbung der Proteine im Gel. Eine Quantifizierung der Banden ist nicht möglich, da keine direkte Beziehung zwischen Farbintensität und Proteinmenge besteht.

## 4.3 Kapillarelektrophorese

### 4.3.1 Methodenentwicklung

Die Kapillarelektrophorese bietet die Möglichkeit, die Allergene weitgehend nativ zu untersuchen. Es ist kein Verkochen oder eine andere wenig schonende Probenvorbereitung nötig. Dieser Vorteil soll auch bei der Entwicklung der Trennmethode erhalten bleiben. Auf extreme pH-Werte sollte daher verzichtet werden. Am geeignetsten sind hierfür beschichtete Kapillaren, die die Adhäsion der Proteine an den Kapillarwänden minimiert. Da nur unbeschichtete Fused-silica-Kapillaren zur Verfügung standen, müssen pH-Werte unterhalb von 4 oder oberhalb des pI der Proteine gewählt werden. Erste Versuche mit Phosphatpuffern (pH-Wert 1-2) zeigten eine gute Trennung, aber eine schlechte Reproduzierbarkeit. Verschiedene Boratpuffer bei pH-Werten oberhalb von 9,6 wurden getestet, wobei ein pH-Wert von 10,1 die beste Trennung bei noch annehmbaren Analysezeiten ergab.

Neben der direkten Quantifizierung der erhaltenen Peaks über UV-Absorption bietet die CE die Möglichkeit zur Aufnahme eines UV-Spektrums für jeden Peak. Damit können die Reinheit und auch gewisse Eigenschaften der Substanzen überprüft werden. Ein Nachteil der Methode ist die lange Analysenzeit von 60 Minuten pro Probe. Außerdem führen schon geringe Änderungen in der Pufferzusammensetzung, wie sie während eines Laufs vorkommen, zu Änderungen in den Retentionszeiten. Nach jedem Lauf sollte daher frischer Puffer verwendet werden.

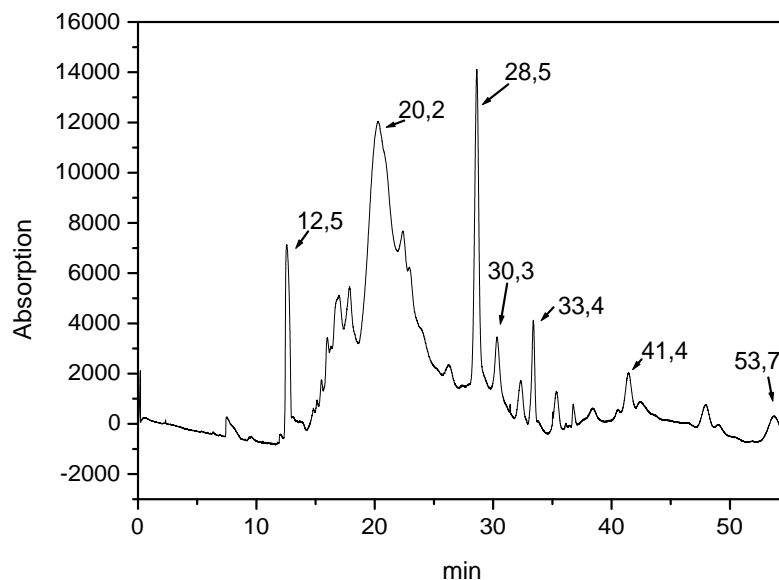
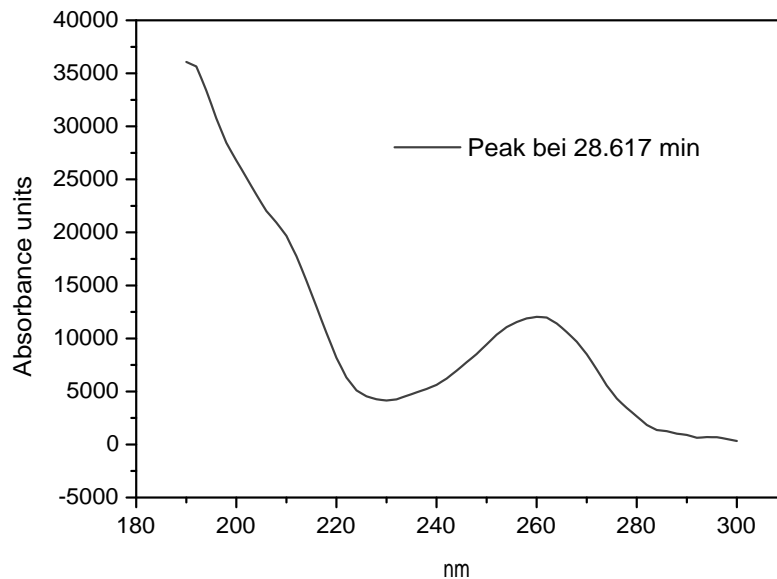


Abbildung 4.7: *Lolium westerwoldicum*, typisches Elektropherogramm



**Abbildung 4.8:** UV-Spektrum des Peaks bei 28 min

In Abbildung 4.7 ist ein typisches Elektropherogramm einer Pollenprobe dargestellt. Die ersten Peaks bis etwa 13 Minuten enthalten die Ionen aus dem Probenpuffer. Zwischen 15 und 25 Minuten erscheint ein schlecht aufgelöster Multippeak. Die Trennung konnte in diesem Bereich nicht verbessert werden. Der scharfe Peak bei 28 Minuten gehört zu einem Protein, wie man am UV-Spektrum [Abb. 4.8] sieht. Bei etwa 214 nm liegt eine Schulter typisch für Absorption durch die Peptidbindung. Das zweite Maximum bei 258 nm deutet auf aromatische Aminosäuren wie Tryptophan oder Phenylalanin hin. Der Flächenanteil dieser Substanz liegt bei etwa 30 %.

Zwischen 30 und 55 Minuten liegen mehrere Peaks, deren Muster und Flächenanteile je nach Pflanzencharge variieren. Im Bereich von 258 nm zeigen sie Absorption, was auf aromatische Komponenten hindeutet. Die Allergene des Weidelgrases enthalten aromatischen Aminosäuren in verschiedenen Anteilen, so dass es sich hier um Allergene handeln könnte.

### 4.3.2 Versuche zur Identifizierung von Allergenen im Elektropherogramm

Um herauszufinden, welche der Proteine im Elektropherogramm allergisch relevant sind, wurden verschiedene Ansätze erprobt, da die Allergene des Weidelgrases in reiner Form kommerziell nicht erhältlich sind.

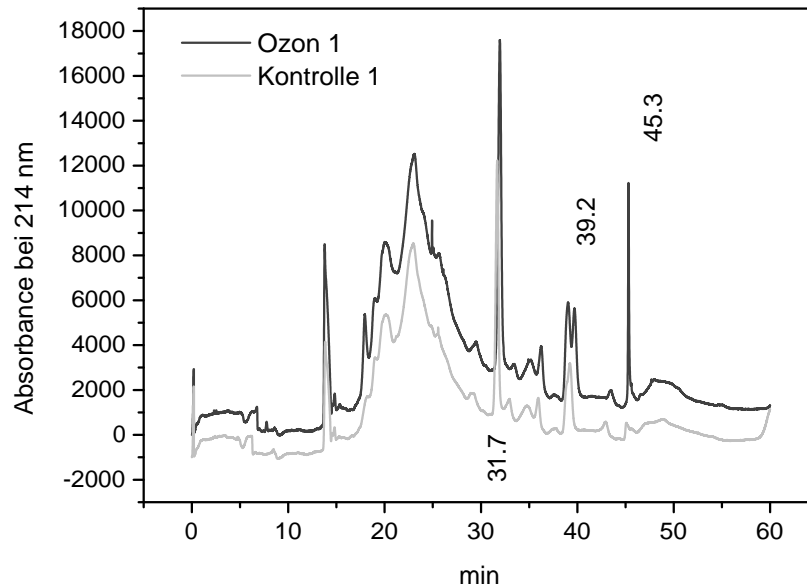
- Aus einem präparativen SDS-Gel wurden die allergisch relevanten Banden ausgeschnitten und das Protein daraus eluiert. Mithilfe des Dotblot wurde bestätigt, dass das interessierende Protein in der Lösung vorhanden ist. Diese Proteinlösungen wurden in der Kapillarelektrophorese als Standard verwendet. Als Vergleich dient ein Puffer, mit dem freies SDS-Gel extrahiert wurde. Es konnte kein Proteinpeak im Elektropherogramm identifiziert werden. Vermutlich durch Gelbruchstücke, die über den ganzen Zeitraum im Elektropherogramm erscheinen, wird das Allergen überdeckt. Durch das Kochen mit SDS kann die Ladung des Proteins im nativen Extrakt so verändert worden sein, dass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld völlig anders ist als die des nativen Proteins. Versuche mit einer nativen Gelektrophorese brachten keine besseren Ergebnisse.
- Die Sammlung einzelner Fraktionen nach einem Lauf der Kapillarelektrophorese und anschließende Dotblot-Detektion der Allergene ist aus apparativen Gründen nicht möglich.
- Mischt man eine Lösung eines Allergens mit einem spezifischen Antikörper, findet eine Reaktion zwischen den Molekülen statt und es entsteht abhängig von der Bindungsstärke ein Allergen-Antikörperkomplex. Nimmt man das Elektropherogramm der Allergenlösung auf und vergleicht es mit dem Elektropherogramm des Allergen-Antikörpergemisches, sollte ein Proteinpeak verschwinden und ein neuer Komplexpeak auftauchen.  
Ein Pollenextrakt wurde mit mAb gegen Phl p 5 in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen gemischt und die Lösung in der CE getrennt. Es konnte kein Peak als Allergen identifiziert werden. Der gewählte pH-Wert von 10 ist vielleicht zu alkalisch und die entstandene Allergen-Antikörperbindung ist zu schwach, um unter diesen Bedingungen bestehen zu bleiben. Ähnliche Versuche wurden mit Allergikerseren unternommen. Da hier Antikörper gegen mehrere Proteine enthalten sind, ist das Elektropherogramm der Mischung dem des reinen Allergenextraktes kaum noch ähnlich. Fast alle Peaks ändern ihre Position, vielleicht auch durch unspezifische Bindungen, so dass auch hier kein Allergen zugeordnet werden kann. Beim Arbeiten mit Serum, auch mit gefiltertem, kommt es häufig zum Verstopfen der Kapillare.

Obwohl es nicht gelungen ist, den Signalen des Elektropherogramms Allergene zuzuordnen, kann man die Kapillarelektrophorese einsetzen, um die Zusammensetzung von Extrakten zu vergleichen. Man ist nicht wie bei der SDS-Elektrophorese auf Proteine beschränkt, alle UV-aktiven Substanzen geben ein Signal. Durch den direkten Zusammenhang zwischen Absorptionsintensität und Menge sind Mengenvergleiche genauer möglich als bei den gescannten Gelen.

### 4.3.3 Vergleich von ozonisierten und Kontrolleextrakten

#### 4.3.3.1 *Lolium westerwoldicum* 2001

Bei den Pollen, die bei einem Tag-Nacht-Programm mit 80 ppb/0 ppb Ozon begast wurden, zeigte sich im Elektropherogramm bei 45 min ein zusätzlicher Peak [Abb. 4.9].



**Abbildung 4.9:** Elektropherogramm von begasten und unbegasteten Pollenproben

Auch bei den in derselben Versuchsreihe gemessenen Proben bestätigte sich das Vorhandensein eines zusätzlichen Peaks. Das UV-Spektrum dieses Peaks ist in Abbildung 4.10 zu sehen. Das Absorptionsmaximum der Substanz liegt bei 195 nm, ein weiteres Maximum bei 260 nm ist nicht zu erkennen. Der Stoff enthält daher vermutlich keine aromatischen Anteile. Ob es sich um ein Protein handelt, kann zur Zeit nicht bestimmt werden. Der Anteil an der Fläche beträgt zwischen 5 und 6 %.

In dem SDS-Gel der oben genannten Proben sind keine zusätzlichen Banden bei den ozonisierten Proben zu erkennen. Das weist darauf hin, dass es sich nicht um ein Protein handelt, sondern vielleicht um ein Kohlenhydrat oder einen sonstigen Pflanzeninhaltsstoff.

Bei einem Ozon-Tageswert von 140 ppb ist ebenso wie bei 80 ppb ein weiterer, intensiver Peak bei 39 Minuten zu beobachten [Abb. 4.11]. Dessen Anteil an der Fläche ist höher als bei der vorhergehenden Proben (20 %).



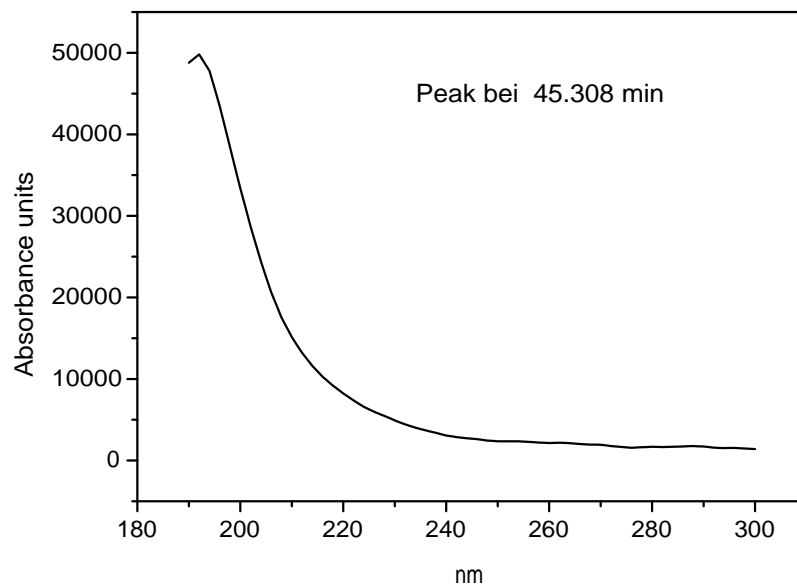


Abbildung 4.10: UV-Spektrum des zusätzlichen Peaks

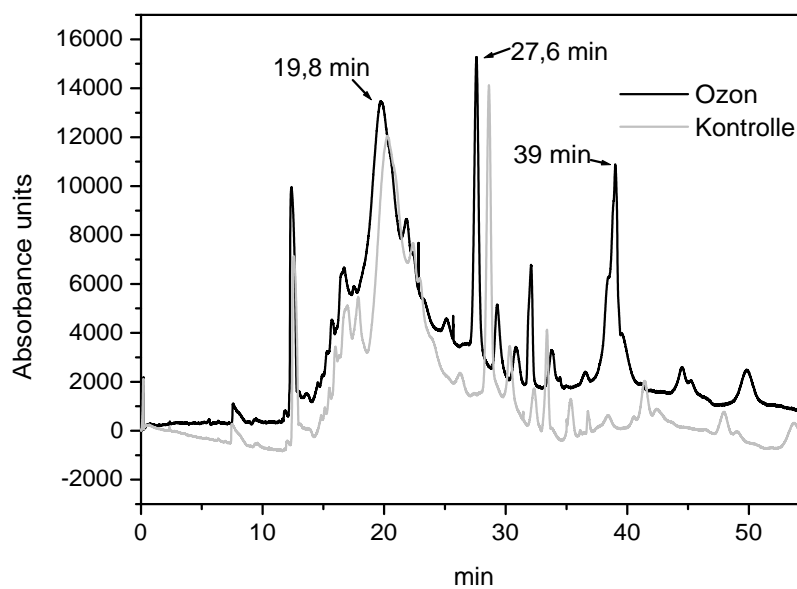


Abbildung 4.11: Vergleich ozonbegaste Proben-Kontrolle (Charge 2)

Diese Ergebnisse ließen sich in den täglich gesammelten Proben von 2002 nicht wiederholen. Die Elektropherogramme von begasten und unbegasten Pollen zeigen hier ein sehr ähnliches Peakmuster [Abb. 4.12], das heißt keine zusätzlichen Peaks. Beim Großteil der Versuche sind nur geringe Unterschiede in der Menge oder leichte Verschiebungen der Retentionszeiten zu erkennen, die keinem bestimmten Verlauf folgen.

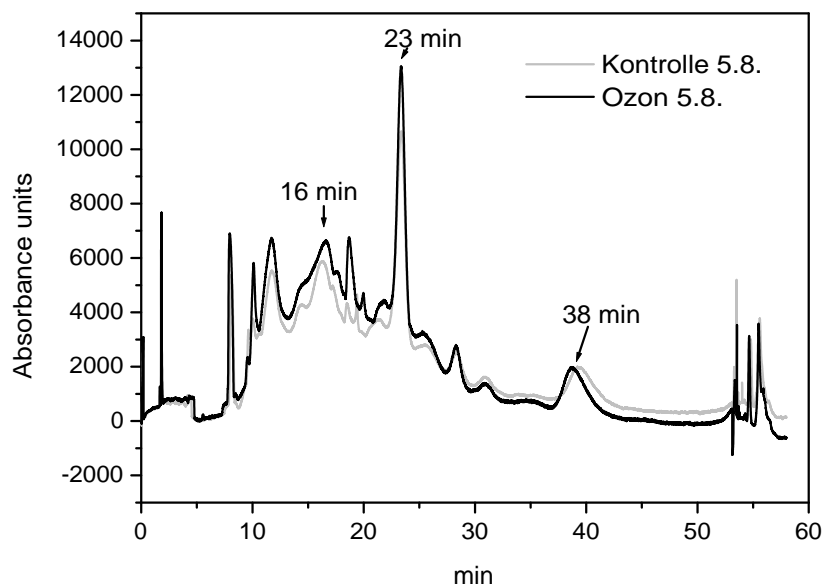


Abbildung 4.12: Elektropherogramm *Lolium multiflorum* Pollenextrakt

#### 4.3.3.2 *Lolium multiflorum*

Bei Proben von *Lolium multiflorum* Pollen konnte in keiner Probe ein zusätzlicher Peak beobachtet werden.

Auch über den Vergleich der prozentualen Flächenanteile der einzelnen Peaks sind keine Unterschiede in der Menge an Substanz zu erkennen, die man auf Ozon zurückführen könnte. Bei den in den Klimakammern in Essen gewonnenen Proben zeigt sich ein abweichendes Peakmuster, was auf die längere Lagerung (obwohl bei  $-20\text{ °C}$ ) zurückzuführen sein kann. Proteine fallen bei längerer Lagerung aus oder werden von Proteasen zersetzt. In den Probegefäßen ist teilweise ein Niederschlag zu beobachten.

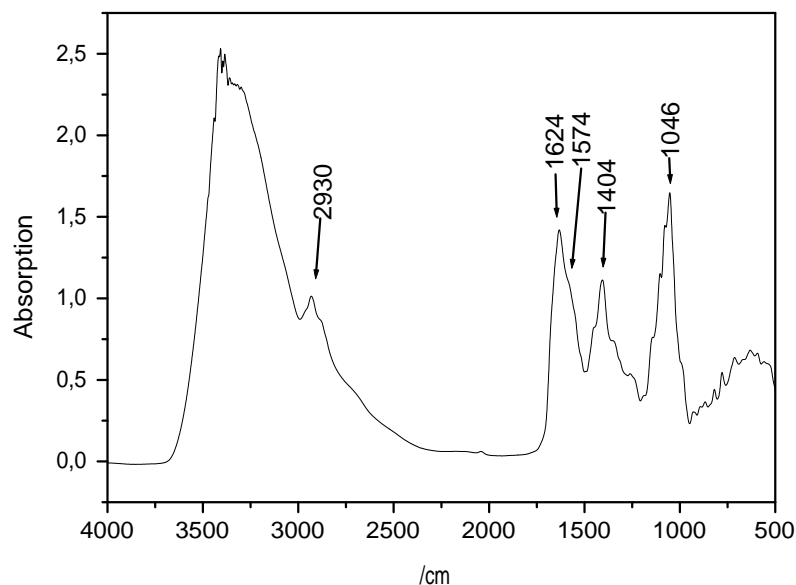
#### 4.3.4 Fazit

In den Elektropherogrammen zeigen sich nur in zwei Versuchsreihen mit *Lolium westerwoldicum* Unterschiede in der Zusammensetzung. Es ist ein zusätzlicher Peak bei etwa 40 min zu erkennen. Es kann nicht nachgewiesen werden, um welche Substanz es sich handelt, aufgrund des UV-Spektrums ist ein Protein unwahrscheinlich. Bei den weiteren Untersuchungen mit *Lolium westerwoldicum* und *Lolium multiflorum* konnte dieses Ergebnis nicht wiederholt werden. Mit der CE können Aussagen über Veränderungen in der Zusammensetzung einer Probe gemacht werden. Um diese Diskrepanzen zu charakterisieren, sind begleitende Untersuchungen nötig.

## 4.4 FTIR

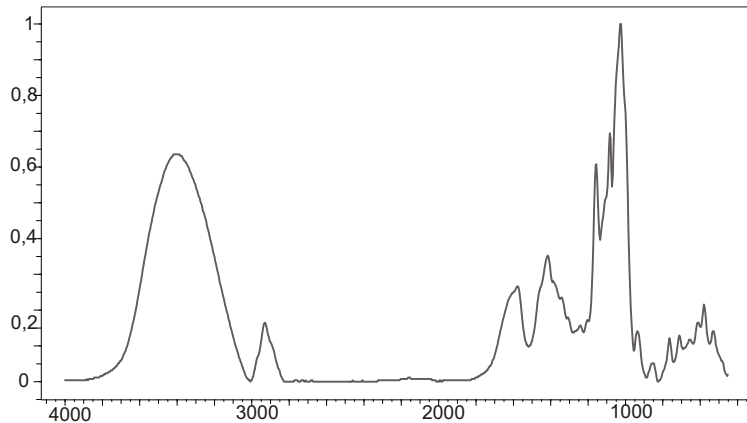
### 4.4.1 Spektren

Abbildung 4.13 zeigt das typische FTIR-Spektrum eines Pollenextraktes. Aufgrund der Heterogenität der Probe überlappen sich die einzelnen Banden stark, aber die Schwingungsbereiche sind noch zu erkennen. Zwischen 3000 und

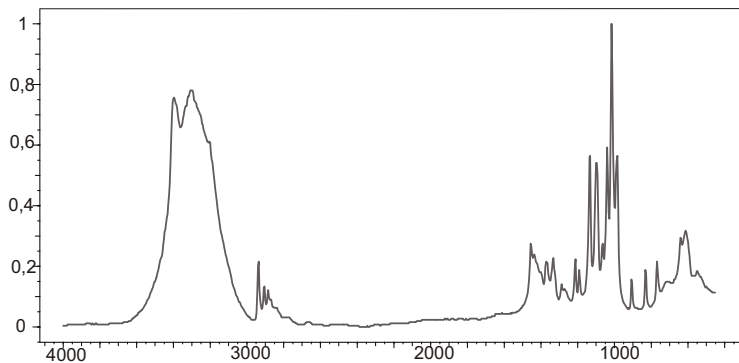


**Abbildung 4.13:** Typisches FT-IR eines *Lolium*-Pollenextrakts

3500  $\text{cm}^{-1}$  liegen die Absorptionsbanden der -OH Gruppen aus verschiedenen Substanzen wie zum Beispiel Carbonsäuren. Die Bande bei 2900  $\text{cm}^{-1}$  ist auf C-H Schwingungen zurückzuführen. Die Haupt-Amid 1-Bande schwingt bei 1635  $\text{cm}^{-1}$ , die Amid 2-Bande ist als Schulter bei 1574  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen. Zwischen 1260 und 1460  $\text{cm}^{-1}$  liegen die Schwingungsbänder der Carbonsäurefunktion, zwischen 1000 und 1200  $\text{cm}^{-1}$  schwingen Kohlenhydrate. Unterhalb von 1000  $\text{cm}^{-1}$  beginnt der Fingerprintbereich. Auffällig ist die fehlende Unterteilung der Amidbande in Amid 1 und 2, wie sie z.B. bei BSA zu erkennen ist. Hier scheint eine weitere Stoffgruppe zu schwingen, vielleicht aus löslichem Zucker wie Glukose (Abb. 4.14 a)) oder Stärke (Abb. 4.14 b)), die in einem Pollenextrakt vorhanden sein kann. In dieser Gegend schwingen auch Phosphat- gegen Zuckergruppen, so dass auch phosphorylierte Zucker vorliegen können (Glukose-1 bzw.-6 phophat, sowie N-acetyldiglukosamin, 4 diphosphate [130]).



(a) Stärke



(b) Glukose

**Abbildung 4.14:** FT-IR Spektren typischer Polleninhaltsstoffe (Spektren: Bruker Optics, Ettlingen)

#### 4.4.2 Vergleich begaste - unbegaste Probe

Mit bloßem Auge sind in den Spektren von begastem und unbegastem Pollen keine Unterschiede zu erkennen. In der 1. Ableitung der Spektren von *Lolium westerwoldicum* sind die Kurvenverläufe im Bereich zwischen 1200 und 900 cm<sup>-1</sup> aber doch verschieden (Abb. 4.15). Führt man eine Clusteranalyse in diesem Bereich durch (Abb. 4.16), werden die Spektren nach ihrer Ozonexposition geordnet. Die Heterogenität ist mit 0,1 sehr gering.

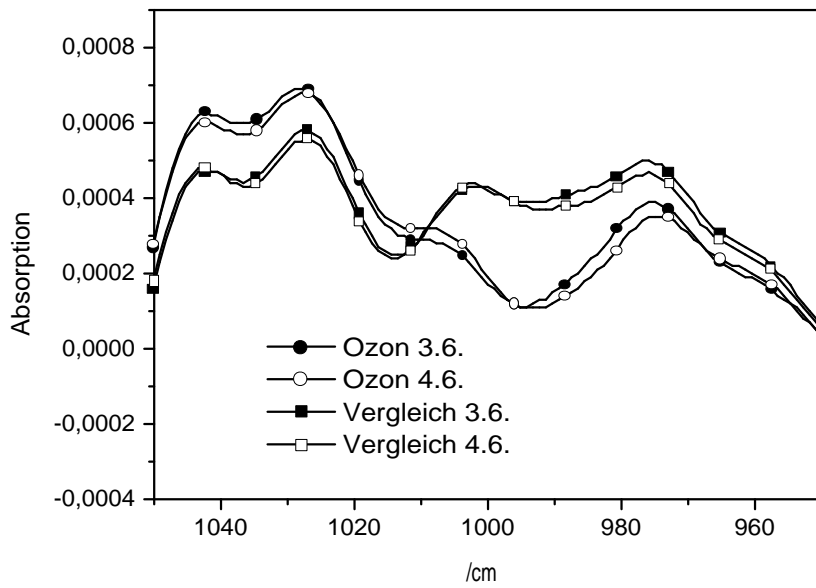
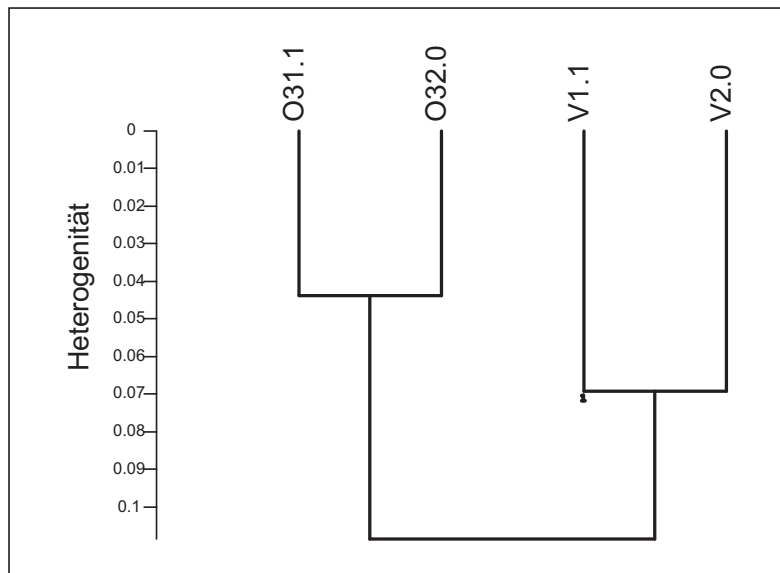


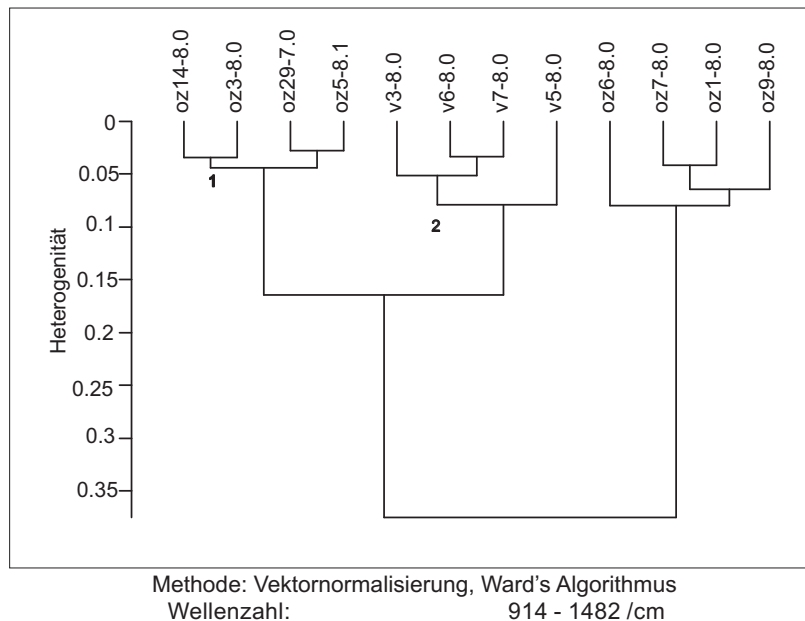
Abbildung 4.15: Erste Ableitung von ozonbegasten und Kontrollpollenextrakten



Methode: Vektornormalisierung, Ward's Algorithmus  
Wellenzahl: 1210-927 /cm

Abbildung 4.16: Clusteranalyse *Lolium westerwoldicum*

Beim zweiten Versuch mit *Lolium westerwoldicum* sind die Heterogenitäten zwischen den Spektren größer, es treten aber Fehlermeldungen auf, das heißt, es gibt Spektren, die einem Spektrum außerhalb des Clusters ähnlich sind. Die Proben vom 14.8. und vom 29.7. fallen heraus, vermutlich wegen zu geringer Proteinkonzentration (Abb. 4.17).



**Abbildung 4.17:** Clusteranalyse *Lolium westerwoldicum*, August 2002

Bei den Versuchen mit *Lolium multiflorum* zeigte sich eine Heterogenität von 0,3 zwischen begasteten und Kontrollpollen (Abb. 4.18). Innerhalb jedes Clusters beträgt die Heterogenität etwa 0,1. Liegt zwischen diesen Werten ein Faktor größer als zwei, kann man von einer signifikanten Unterscheidung sprechen. Am deutlichsten wird der Unterschied jeweils bei Verwendung des Wellenzahlenbereichs um  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Das weist auf Differenzen im Kohlenhydratanteil der Extrakte hin. Allerdings sind diese Unterschiede sehr gering, mit bloßem Auge nicht zu erkennen. In der Summe ermöglichen sie aber eine Unterscheidung der Spektren.

#### 4.4.2.1 Unterschiedliche Weidelgrasarten

Durch Clusteranalyse im Fingerprintbereich können die Spekten von *Lolium multiflorum* und *Lolium westerwoldicum* unterschieden werden (Abb. 4.19). Hier liegt die Heterogenität bei 0,6. Die Arten zeigen also mehr Verschiedenheit untereinander als durch Ozon hervorgerufen werden.

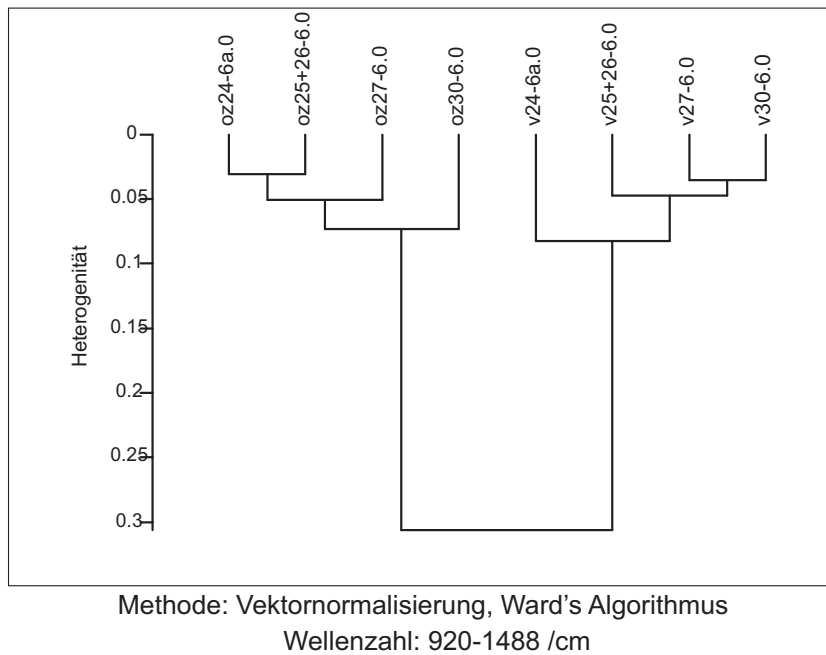
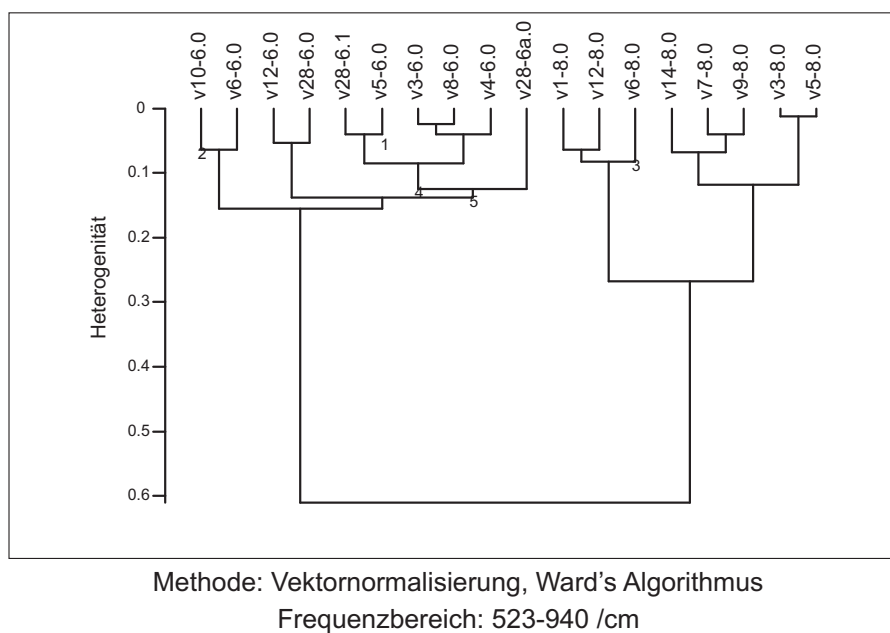


Abbildung 4.18: Clusteranalyse *Lolium multiflorum*

### 4.4.3 Fazit

Zwischen den Spektren von ozonisierten und Kontrollpollen bestehen nur geringe Differenzen. Damit sind die Zusammensetzungen der Extrakte sehr ähnlich. Geringe Wellenzahlschwankungen, wie sie durch unterschiedliche Faltungen von Proteinen hervorgerufen würden, gehen in der Zusammensetzung der Probe verloren.





**Abbildung 4.19:** Unterscheidung von *Lolium multiflorum* und *westerwoldicum* in der Clusteranalyse (V1-8 bis V14-8: *Lolium westerwoldicum*, V3-6 bis V28-6: *Lolium multiflorum*)

# Kapitel 5

## Zusammenfassung und Ausblick

Erhöhte Ozonwerte in den Sommermonaten bedeuten für Pflanzen oxidativen Stress. Durch verschiedene Mechanismen sind sie in der Lage, den Stress in gewissem Maß abzuwehren. Darüberhinaus entstehen Schäden an der Pflanze. In dieser Arbeit wird überprüft, ob sich durch Induktion dieser Mechanismen oder durch Schädigung der Pflanzen Änderungen in der Allergenität von Graspollen ergeben.

Um Graspflanzen unter definierten Ozonwerten sowie Licht- und Temperaturverhältnissen zur Blüte bringen zu können, wurden zwei Begasungskammern mit der Möglichkeit zur Aufgabe verschiedener Ozonwerte aufgebaut.

Pollen, die unter Ozoneinfluss gebildet worden sind, und Kontrollpollen wurden mit verschiedenen analytischen Methoden untersucht.

- Mit ELISA-Tests wurde der Gehalt an Gruppe 5-Allergen in den Extrakten bestimmt und zum Gesamtproteingehalt in Beziehung gesetzt. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen ozonisierten und Kontrollpollen nachweisen.
- Das Gesamtproteinspektrum beider Probenarten wurde durch SDS-Elektrophorese verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede in den Bandenmustern und -intensitäten beobachtet werden. Im Westernblot zeigten begaste und unbegaste Pollen keine unterschiedlichen Eigenschaften in der Antikörperbindung.
- Durch Kapillarelektrophorese wurde die Zusammensetzung der nativen Extrakte verglichen. Bei zwei Chargen konnte ein zusätzlicher Peak bei 45 Minuten beobachtet werden. Um welche Art der Substanz es sich hier handelt, konnte nicht bestimmt werden.
- Durch FTIR-Spektroskopie sind Vergleiche der Ähnlichkeit der Extrakte auf statistischer Basis möglich. In der Clusteranalyse zeigten sich nur geringe Differenzen zwischen ozonisierten und Kontrollpollen. Sie scheinen vor allem im Bereich der Schwingungen von Kohlenhydraten zu liegen.

Die wahrscheinlichste Hypothese für das Auftreten erhöhter Allergengehalte bei Ozonexposition ist die stärkere Expression eines Stressproteins, das als Allergen wirkt. Allerdings konnte nur die Menge von Gruppe 5 Allergen bestimmt werden. Dass sich die Mengen der anderen Allergene geändert haben, kann nicht ausgeschlossen werden. Um Aussagen über die Allergenität der Extrakte machen zu können, wären RAST-Hemmtests mit einem Poolserum nötig gewesen. SDS-Elektrophorese ist zur Erfassung solcher Unterschiede im Nanogramm-Bereich zu ungenau.

Durch Ozon kann es zu Änderungen in der Struktur, fehlerhafte Expression von Proteinen oder veränderten posttranslativen Modifikationen kommen. Allergene können auch nur in Bruchstücken vorhanden sein. Dadurch auftretende Molmassenverschiebungen konnten in der Elektrophorese nicht beobachtet werden. Epitope können zerstört sein oder für Antikörper besser zugänglich sein. Auch veränderte Bindungseigenschaften durch modifizierte Epitope konnten im Blot nicht nachgewiesen werden.

Auch die Expression eines zusätzlichen Proteins wäre möglich. Damit es eine allergene Wirkung haben kann, muss es IgE-bindende Epitope mit bereits etablierten Allergenen gemeinsam haben oder zu einer eigenen Sensibilisierung führen.

Die FTIR-Spektren weisen auf Modifikationen im Kohlenhydratanteil der Extrakte hin. Davon kann ein glykosyliertes Protein betroffen sein, ebenso wie lösliche Stärke oder Zucker im Pollen. Schon in früheren Arbeiten wurden Veränderungen in der Stärkeeinlagerung durch Ozon beobachtet. Ob es eine Verbindung zur Allergenität gibt, konnte nicht nachgewiesen werden.

Obwohl es in der vorliegenden Arbeit nicht gelang, einen Zusammenhang zwischen veränderter Allergenität von Graspollen und erhöhten Ozonwerten nachzuweisen, kann die These auch nicht widerlegt werden.

Es konnte hier nur eine Grassorte untersucht werden. Andere Arten oder Sorten zeigen andere Sensitivitäten gegenüber Ozon und damit andere Reaktionen. Es besteht die Möglichkeit, dass sogar Individuen einer Art verschieden auf Ozon reagieren. Das kann neben der genetischen Disposition auch von den Lebensbedingungen der Pflanze vor und während der Ozonexposition abhängen. Die Aufnahme von Ozon über die Stomata wird stark von der (Luft-)Feuchte beeinflusst. Ist sie gering, verdunstet die Pflanze wenig Wasser, die Stomata bleiben geschlossen, und die Aufnahme von Ozon ist geringer als bei großer Feuchtigkeit. Ein Zusammenwirken mit der natürlichen UV-Strahlung bei der Schädigung ist auch möglich. UV-Strahlung ist in den Indoor-Klimakammern nicht vorhanden.

Aus Zeitgründen konnten nur wenige verschiedene Ozonprogramme ausprobiert werden. Das Zeitfenster zur Schädigung der Pollen ist möglicherweise verpasst worden oder die Ozonwerte lagen in einem falschen Konzentrationsbereich. Bei Exponierung über längere Zeit trat vielleicht ein Gewöhnungseffekt ein, der zur

Abwehr des Stressfaktors Ozon beiträgt.

Weitere Forschung ist zur Bestimmung der natürlichen Schwankung des Allergengehalts in Pollen in Abhängigkeit von den Lebensbedingungen wie Temperatur, Feuchte, Licht und Boden und auch von der individuellen Pflanze nötig. In verschiedenen Jahren geerntete Pollenchargen können durchaus voneinander in Protein- und Zuckergehalt abweichen. Variationen in diesen Parametern überdecken unter Umständen alle durch Ozon verursachten Veränderungen.

Ein besonders wichtiger Parameter für den Allergiker ist die Menge an Pollen, die eine Pflanze freisetzt. Die Schäden durch Ozon können dazu führen, dass eine Pflanze weniger Pollen bildet, was eine veränderte Allergenität des einzelnen Pollen weniger bedeutungsvoll macht.

# Anhang A

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumin	ppb	parts per billion
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan- sulfonat)	ppm	parts per million
CBD	Cellulose binding domain	PPN	Peroxypropionylnitrat
CE	Kapillarelektrophorese	PR-Protein	pathogen-related Protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	PVDF	Polyvinylidendifluorid
EOF	Electroosmotic flow	SDS	Sodiumdodecylsulfat
mAb	monoklonaler Antikörper	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat		
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure		
NC	Nitrocellulose		
OPD	o-Phenyldiamin		
PA	Polyacrylamid		
PAN	Peroxyacetylnitrat		
pI	isoelektrischer Punkt		
POD	Meerrettichperoxidase		

# Anhang B

## Begasungsversuche und Pflanzen

### B.0.4 *Lolium multiflorum*

Pflanzen *Lolium multiflorum* Partie PC 70302 (2002) bzw. WV8RKPH6-101 (2001) werden aus einem Feld der DSV (Deutsche Saatgutveredelung, Thüle, Salzkotten) ausgegraben. Sie werden in je drei Pflanzen geteilt, so dass drei genetisch identische Individuen entstehen. Jede Pflanze wird in einen Topf (Durchmesser 15 cm, Höhe 12 cm, 2 l) gepflanzt und in einen Topf mit Wasserreservoir (Höhe 21 cm) gestellt. Über einen Docht aus Asbestfasern (2000) oder Bewässerungsfließ (ab 2001) wird das Wasser in die Töpfe gesaugt und sorgt für gleichmäßig feuchte Erde. *Lolium multiflorum* wurde in den Begasungskammern des LUA Essen und in Paderborn eingesetzt.

Da die Pflanzen im Freiland überwintern konnten, ist keine Vernalisation notwendig.

### B.0.5 *Lolium perenne*

*Lolium perenne* v. Livree wird in Kulturtöpfen im Gewächshaus angesät, etwa 3 Wochen nach dem Keimen vereinzelt und weitere 6 Wochen heranwachsen gelassen. Anschließend werden sie einem künstlichen Winter (2 Wochen bei 14 °C, 6 Wochen bei 7 °C, 2 Wochen bei 14 °C) ausgesetzt. Danach kann durch Lichtphasen länger als 16 Stunden die Blühphase induziert werden.

### B.0.6 *Lolium westerwoldicum*

*Lolium westerwoldicum* v. Lifloria wird in Kisten von 60 mal 80 cm (Höhe 15 cm) oder 55 mal 60 cm (Höhe 10 cm) ausgesät. Die Dichte beträgt etwa 2,5 g Samen pro 0,3 m<sup>2</sup>. Bei dichterem Saat bleiben die Pflanzen und Ähren klein und ergeben geringere Pollenausbeute. Nach etwa 6 Wochen auf dem Balkon im Sommer oder im Winter im Labor oder in den Kammern blühen die Pflanzen. Beim Anwachsen unter natürlichem Licht wachsen die Gräser schneller und sind weniger

empfindlich gegen Schädlinge.

## B.0.7 Verwendete Materialien

### B.0.7.1 Pflanzerde Spezifikation

Hochmoortorf, mäßig stark zersetzt (H2-H8)	60 %
Rindenhumus	30 %
Grünschnittkompost	30 %
Salzgehalt	3,0 g/l
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,0-6,5
Nährstoffe:	200-500 mg/l N
	200-500 mg/l P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
	300-600 mg/l K <sub>2</sub> O

### B.0.7.2 Dünger

Wuxal N:K:P 12:4:6 5 ml auf 1 l Wasser, alle 3 Wochen

### B.0.7.3 Schädlingsbekämpfung

gegen Blattläuse: Pirimor (Wirkstoff Primicarb) 5 % in Wasser  
 gegen Mehltau: Milgo-E (Ethirimol) 0,3 % in Wasser

Schädlingsbekämpfung wurde, wenn nötig, gleichmäßig in beiden Kammern durchgeführt.

## B.0.8 Lampen in den Klimakammern

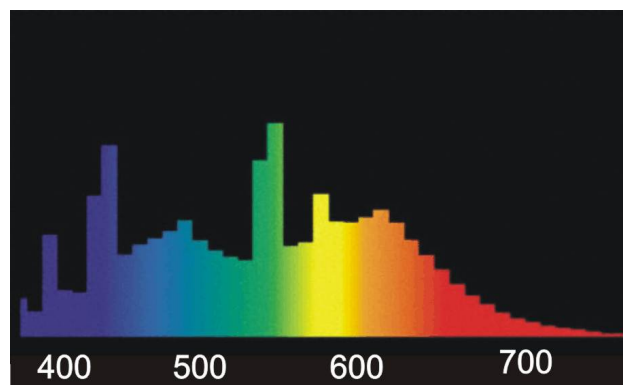


Abbildung B.1: Osram Biolux Lichtfarbe 72-966, 36 W

### B.0.9 Kalibrierung der Feuchtesensoren

Die Feuchtesensoren wurden durch verschiedene Schwefelsäuren kalibriert, über denen sich abhängig von der Konzentration, eine bestimmte Luftfeuchte einstellt.

$\delta(\text{H}_2\text{SO}_4)$	Konzentration (mol/l)	Luftfeuchte oberhalb (%)
1,50	9,2	18,8
1,30	5,3	58,3
1,25	4,3	70,4
1,20	3,4	80,4
1,15	2,5	88,8

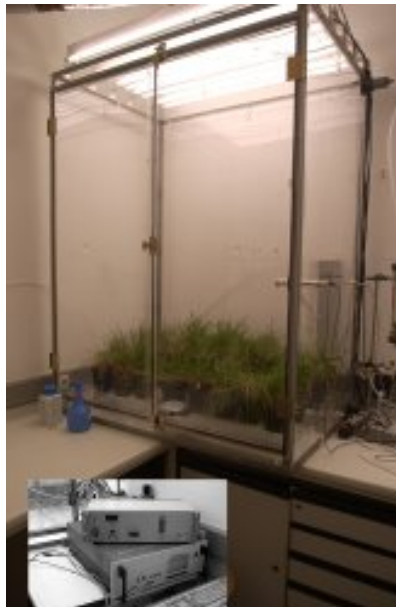


Abbildung B.2: Klimakammern Paderborn



# Anhang C

## Versuchsdurchführungen

### C.1 Extraktion der Pollen

<b>Extraktionspuffer</b>	pH 7,8
0,1 m/l $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	7,9 g/l
$\text{NaN}_3$ (optional)	0,01 g/l

Pollenproben werden im Verhältnis 2 % w(Pollen)/v(Puffer) mit dem Extraktionspuffer gemischt und bei 4°C 23 h auf dem Schüttler extrahiert. Anschließend werden die Extrakte bei 4°C und 2000 x g für 25 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen, aliquotiert und sofort bei -20°C eingefroren.

### C.2 Proteingehaltsbestimmung (Lowry-Test)

Arbeitsschritt	verwendete Lösung	Zeit
Ansetzen der Standardreihe	BSA in Probenpuffer: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 und 2,0 mg/ml	
Pipettieren in die Wells der MTP	5 $\mu\text{l}$ Probe bzw. Standard oder Blindlösung	
Mixen im Plattenreader	25 $\mu\text{l}$ Lösung A	5 s
Inkubationszeit	200 $\mu\text{l}$ Lösung B	15 min
Vermessen bei 650 nm		

Die Konzentrationen der Standards werden gegen die optische Dichte aufgetragen und die Kalibrierkurve durch lineare Regression erstellt (Programm: „Easy-Fit“).

### C.3 ELISA

Alle Puffer und Lösungen werden mit doppelt destiliertem Wasser angesetzt.

<b>Beschichtungspuffer</b>	pH 9,6	<b>PBS/Tween</b>	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	21,0 g/l	NaCl	8,4 g/l
NaHCO <sub>3</sub>	16,8 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g/l
nicht titrieren		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,08 g/l
		Tween 20	500 µl/l

**Ansetzen der Standardverdünnungsreihe:** 10 Verdünnungen

1. 2,5 µg Phl p 5/ml    10µl Phl p-Extrakt 81292 + 1,2 ml PBS-Tween
2. 250,0 ng/ml        100 µl Extrakt 1 + 900 µl PBS-Tween
3. 125,0 ng/ml        500 µl Extrakt 2 + 500 µl PBS-Tween
4. 62,5 ng/ml         500 µl Extrakt 3 + 500 µl PBS-Tween
- usw.
10. 0,98 ng/ml        500 µl Extrakt 9 + 500 µl PBS-Tween

Arbeitsschritt	Lösung	Volumen oder Zeit
Beschichten der Mikrotiterplatte mit Antikörper	10 µg/ml AB 1D11 in Beschichtungspuffer	50 µl/well, über Nacht, 4°C
3 x waschen	PBS/Tween	100 µl/well
Auftragen der Proben bzw. Standardreihe in Doppel- oder Dreifachbestimmung		50 µl/well 1 h, 37°C
3 x waschen	PBS/Tween	100 µl/well
Reaktion mit biotiniertem AB	AB 2B3 in PBS/Tween, 1:250 verd.	50 µl/well, 1 h, 37°C
3 x waschen	PBS/Tween	100 µl/well
Reaktion mit Streptavidin-Peroxidase	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (0,25 µg/ml) in PBS/Tween 1:1000	50 µl/well, 1 h, 37°C
3 x waschen	PBS/Tween	100 µl/well
Reaktion mit POD-Substrat	POD/Harnstoff/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Wasser	50 µl/well, ca. 15 min im Dunklen
Abstoppen	1,5 n H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 µl/well

Die Absorbtion wird bei 492 nm im Plattenreader SLT Spectra gemessen und mit dem Programm „SLT EasyFit“ ausgewertet.

## C.4 Denaturierende, nicht reduzierende SDS-Gelelektrophorese

Elektrophoresen wurden mit einer Biorad Mini-2D-Cell (Gelgröße 8 cm x 10 cm, Dicke der Gele 0,5 cm) und einem Netzgerät Biorad Power Supply 1000 durchgeführt.

### C.4.1 Puffer

**Gelpuffer Trenngel** 1,5 mol/l Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen

**Gelpuffer Sammelgel** 0,5 mol/l Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen

**Probenpuffer** Sammelgelpuffer 2,5 ml  
 Glycerin 2,0 ml  
 10 % w/v SDS 4,0 ml  
 Bromphenolblau (0,1 %) 0,5 ml  
 mit H<sub>2</sub>O auf 10 ml auffüllen

**Laufpuffer** Tris Base 29 g  
 Glycin 144 g  
 SDS 10 g  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen pH ca 8,3; nicht einstellen

### C.4.2 Gießen des Gels

<b>Trenngel</b> , c=2,7 %	T=10 %	12 %	15 %
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1,38 ml	0,81 ml	0,23 ml
Trenngel-Puffer	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
10 % w/v SDS	50 µl	50 µl	50 µl
Lsg. Gel A	1,62 ml	2,03 ml	2,44 ml
Lsg. Gel B	0,675 ml	0,85 ml	1,02 ml
APS 10 %w/v	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
<b>Sammelgel</b> , c=2,7 %	T=4 %		
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1,96 ml		
Sammelgelpuffer	1,25 ml		
10 % w/v SDS	50 µl		
Lsg. Gel A	1,22 ml		
Lsg. Gel B	0,5 ml		
APS 10 % w/v	40 µl		
TEMED	5 µl		

Zunächst wird die Trenngellösung gemischt, Katalysator (APS) und TEMED dürfen erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben werden. 5 ml der Lösung werden vorsichtig am Rand der Glasplatte entlang in die Gießkassette pipettiert und mit ca. 1 ml Tertiärbutanol überschichtet. Nach 45 Minuten ist das Gel polymerisiert, der Alkohol wird abgeschüttet und die Kassette bis zum Rand mit Sammelgelmischung gefüllt. Zum Formen von Probenaschen wird sofort ein passender Kamm in die Lösung gedrückt, so dass keine Luftblasen eingeschlossen werden. Nach etwa 30 Minuten ist die Polymerisation abgeschlossen, der Kamm kann entfernt und das Gel verwendet werden.

### C.4.3 Vorbereitung der Proben

Proteinlösung wird im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt, gut durchmischt und etwa 10 Minuten im Wasserbad verkocht. Nach dem Abkühlen können die Proben mit einer Mikrospritze auf das Gel gegeben werden.

### C.4.4 Durchführung der Elektrophorese

Die Kathodenkammer der Mini-2D-Cell wird mit 100 ml Laufpuffer gefüllt und die Proben werden aufgetragen. In die Anodenkammer werden 500 ml Laufpuffer gegeben, die Elektrophoresezelle geschlossen und eine Spannung von 125 V angelegt. Während des Laufes fällt der Strom von etwa 30 mA auf bis zu 10 mA. Wenn die Farbstofffront das Ende des Gels erreicht hat (ca. 90 Minuten), kann die Elektrophorese beendet werden.

## C.5 Kolloidale Coomassiefärbung

Arbeitsschritt	verwendete Lösung	Zeit
Fixieren der Proteine	79 ml H <sub>2</sub> O, 1 ml o-Phosphorsäure, 20 ml Methanol	1 h auf dem Schüttler
Färben	60 ml H <sub>2</sub> O, 20 ml Roti-Blue 5x, 20 ml Methanol	über Nacht auf dem Schüttler
Waschen	25 % Methanol in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	10 min
Trocknen	70 ml H <sub>2</sub> O, 10 ml Glycerin, 20 ml Ethanol	30 min auf dem Schüttler

Anschließend kann das Gel zwischen zwei nassen Cellophanfolien auf einer Glasplatte getrocknet werden (ca. 24 h). Es wird eingescannt und mit dem Programm Image1D von Pharmacia ausgewertet.

## C.6 Westernblot im Anschluss an die Gelelektrophorese

Nitrocellulose (NC) oder PVDF-Membran auf Gelgröße schneiden, eine Ecke markieren; sechs Blotfilterpapiere auf Gelgröße schneiden.

### C.6.1 Semidry

<b>Kathodenpuffer:</b>		<b>Anodenpuffer 1</b>	pH 6,8
39 ml/l Glycin	2,93 g/l	0,3 mol/l	Tris 36,3 g/l
0,01 % SDS (w/v)	0,1 g/l	0,01 % NaN <sub>3</sub> (s.o.)	0,1 g/l
0,01 % NaN <sub>3</sub> (optional)	0,1 g/l		
		<b>Anodenpuffer 2</b>	pH 8,6
		25 mmol/l Tris	3,03 g/l
		0,01 % NaN <sub>3</sub> (s.o.)	0,1 g/l

Arbeitsschritt	verwendete Lösung	Zeit
Gel äquilibrieren	Kathodenpuffer	5 min
Membran aktivieren (nur PVDF)	Methanol	15 s
Aufbau des Blotsandwich	H <sub>2</sub> O	2 min
	Anodenpuffer 2	5 min
	Graphitelektroden wässern	
	- 2 Filterpapiere in AP1 tränken, auf der Anode plazieren - 1 Filter in AP2 getränkt - Membran - Gel - 3 Filterpapiere in KP getränkt - Kathode + Gewicht	
	Luftblasen durch Walzen mit Pasteurpipette entfernen	
Blot		0,8 mA/cm <sup>2</sup> Gel: 1-2 h 1,2 mA/cm <sup>2</sup> Gel: 1 h 2,5 mA/cm <sup>2</sup> Gel: 30-45 min

Kontrolle des Übergangs

- Ponceau S-Färbung der Membran,
- farbige Markerproteine,
- kolloidale Coomassiefärbung des Gels

### C.6.2 Kapillarblot

**Blotpuffer** pH 8,3

20 mmol/l Tris      2,41 g/l

150 mmol/l Glycin   10,25 g/l

**Aufbau des Blotsandwich**

- 3 Filterpapiere gut in Puffer tränken, auf eine Glasplatte platzieren, Enden in Pufferreservoirs
- Gel darauf, gut mit Puffer tränken, Luftblasen entfernen
- Membran
- 3 auf Gelgröße geschnittene trockene Filterpapiere
- trockenes, saugfähiges Material
- mit Glasplatte und Gewicht beschweren

Der Blot erfolgt durch Kapillarkräfte über Nacht.  
Überprüfung des Bloterfolgs s.o.

## C.7 Immunchemische Detektion

Auf den Blotmembranen können die Allergene je nach Fragestellung mit Humanseren oder monoklonalen Antikörpern detektiert werden.

Waschpuffer: PBS + 0,05 % Tween 20 (siehe ELISA)  
 Inkubationspuffer: PBS + 0,1 % BSA (Fraktion 5)  
 mAb's 1D11 bzw 3G5: 2 µg/ml in Inkubationspuffer  
 Allergiekerseren: 1:5 in Inkubationspuffer  
 Chromogenes Substrat Novex: 1:1 mit H<sub>2</sub>O

Arbeitsschritt	verwendete Lösung	Zeit
Blockieren der freien Bindungsstellen	Blockierungslösung Western Breeze Kit	30 min auf dem Schüttler
Trocknen der Membran		37 °C 1-2 h
Kennzeichnen der Lanes, schneiden in 4-5 mm Streifen und Überführen in Inkubationstray (Biorad)		
Inkubation mit primärem Antikörper	1 ml verd. Serum oder AB-Lsg pro Lane	über Nacht auf Kippschüttler
Waschen	Waschpuffer je 1 ml	3 x 10 min
Inkubation mit sekundärem Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bei Serum: anti-human mouse IgE-AP 1:1000 in Inkubationspuffer</li> <li>• bei mAB: Western Breeze Anti-Mouse AP, 1 ml pro Lane</li> </ul>	3-4 h auf dem Schüttler
Waschen	Waschpuffer je 1 ml	3 x 10 min
Farbreaktion	Chromogenes Substrat 1 ml pro Lane	20-60 min bis Banden erscheinen

Die Membranstreifen werden im Dunklen getrocknet und eingescannt.

## C.8 Kapillarelektrophorese

<b>Gerät:</b>	Beckman-Coulter PACE-MDQ
<b>Kapillare:</b>	Fused-silica, unbelegt, ID 75 $\mu\text{m}$ , L=60/50 cm, CS-Chromatographie Service
<b>Puffer:</b>	100 mmol/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , mit 0,1 n NaOH pH-Wert auf 10,1 einstellen
Vor jeder Analyse spülen:	2 min mit 1 n NaOH und 20 psi Druck 2 min mit 0,1 n NaOH, 20 psi 2 min mit Wasser, 20 psi 2 min mit Boratpuffer, 20 psi
Injektion	9 sec, 0,7 psi
Trennung	15 kV, 20°C, Boratpuffer, 50-60 min
Detektion	PDA-Detektor, 190-300 nm
Nach jeder Analyse spülen:	4 min 1 n NaOH, 20 psi 2 min $\text{H}_2\text{O}$ , 20 psi
Auswertung:	PACE-MDQ Software

Die Proben werden bei Raumtemperatur aufgetaut, zentrifugiert, um Teilchen, die die Kapillare verstopfen können, abzutrennen, und vermessen.

## C.9 FTIR

FTIR-Spektren werden mit einem Spektrometer Bruker IFS 28/B aufgenommen. Dazu werden 30  $\mu\text{l}$  (zweimal nacheinander 30  $\mu\text{l}$  bei sehr geringer Proteinkonzentration) auf das Probenrad gegeben und im Exsikkator getrocknet. Die Messung erfolgt mit einer modifizierten MO-Methode mit 256 Scans. Zum Abgleich wird jeweils der Hintergrund vermessen. Auswertung und Messung erfolgt mit dem Programm „OPUS NT“ bzw. „OPUS 4.0“.



## C.10 Chemikalien und Reagenzien

### C.10.0.1 Markerproteine für die SDS-Elektrophorese:

MG Marker14-94 LMW Electrophoresis Calibration Kit, Pharmacia

Protein	MG (Da)	Protein	MW (Da)
Phosphorylase b	94 000	Carbonic Anhydrase	30 000
Bovine Serum Albumin	67 000	Soybean Trypsin Inhibitor	20 100
Ovalbumin	43 000	$\alpha$ -Lactalbumin	14 400

### C.10.0.2 Acrylamidlösungen

**Rotiphorese Fertiglösungen** Roth  
 Gel A: 30 % w/v Acrylamid  
 Gel B: 2 % w/v Bisarylamid

### C.10.0.3 ELISA-Test Phl-p-5

**Antikörper** Allergopharma J. Ganzer KG  
 Antikörper 1D11, monoklonal (von der Maus)  
 biotynlierter Nachweisantikörper 3B2 (Maus)

**Peroxidase Substrat** Sigma  
 o-Phenylendiamin Dihydrochlorid  
 Urea Hydrogen Peroxide

**Mikrotiterplatten** Nunc Maxisorp C96

### C.10.0.4 Blot

Blotpapier Schleicher und Schuell GB 404 Gel Blotting Paper  
 Membran PVDF Invitrogen Invitrolon PVDF-Filterpaper Sandwich, 0,45  $\mu$ m pore size

### C.10.0.5 WesternBreeze

NOVEX-Invitrogen  
 Chromogenic Western Blotting Immunodetection System  
 bestehend aus Blocking solution, Washing Solution, Secondary AB Solution and  
 Chromogenic Solution

### C.10.0.6 Kolloidale Coomassie-Färbung

Roti-Blue 5-fach Konzentrat Roth

**C.10.0.7 Proteintest Lowry**

Biorad DC Protein Assay

Lösung A alkalisches Cu-tartrat

Lösung B Folin's Reagenz

**C.10.0.8 Sonstige Chemikalien**

Ammoniumhydrogencarbonat		Riedel
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Roth
Anti-Human IgE, AP-konjugiert		Pharmingen International
Bovine serum Albumin V	BSA	
Bromphenolblau		Sigma
Glycin		Merck
Glycerin wasserfrei		Merck
Methanol		Roth
Kaliumphosphat		Merck
Natriumazid		Sigma
Natriumcarbonat		Merck
Natriumchlorid		Merck
Natriumdihydrogenphosphat		Fluka
Di-Natriumhydrogenphosphat		Fluka
Natriumhydrogencarbonat		Roth
Natriumdodecylsulfat		Biorad
Natriumhydroxid		Merck
ortho-Phosphorsäure		Merck
Salzsäure		Merck
Schwefelsäure		
Sodiumdodecylsulfat	SDS	Merck
Streptavidin		Sigma
1,2-Bis(dimethylamino)ethan	TEMED	Roth
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Roth
Polyoxyethylensorbitan-monolaurat	Tween 20	Sigma

# Literaturverzeichnis

- [1] UMWELTFRAGEN, RAT DER SACHVERSTÄNDIGEN FÜR: *Sondergutachten Umwelt und Gesundheit: Risiken richtig einschätzen*. <http://www.umweltrat.de/songut99.htm>, 1999. 1
- [2] RING, J., U. KRAMERN, T. SCHÄFER, D. ABECK, D. VIELUF und H. BEHRENDT: *Environmental risk factors for respiratory and skin atopy: results from epidemiological studies in former East and West Germany*. Int. Arch. Allergy Immunol., 118:403–407, 1999. 1
- [3] MAGNUSSEN, H. und R. JÖRRES: *Umweltschadstoffe und Allergene: Kombinationseffekte*. Pneumologie, 48:521–522, 2001. 1, 2.2.2
- [4] BEHRENDT, H., W.-M. BECKER, C. FRITZSCHE, W. SLIWA-TOMCZOK, J. TOMCZOK, K. FRIEDRICHS und J. RING: *Air pollution and allergy: Experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants*. Int. Arch. Allergy Immunol., 113:69–74, 1997. 1, 2.2.5
- [5] BREITENEDER, H. und O. SCHEINER: *Environmental pollution and pollen allergy - a possible link*. Allergo J., 7:271–274, 1998. 1, 2.2.3.1
- [6] MASUCH, G., J.-TH. FRANZ, K. SCHOENE, H. MÜSKEN, K.-CH. BERGMANN und R. WAHL: *Einfluß von Ozon auf den Gehalt von Gruppe 5 Allergen in Pollen und Pflanzenbestandteilen von Lolium perenne*. 4. Europäisches Pollenflugsymposium, Seiten 10–11, 1997. 1, 2.2.6.1
- [7] HAYEK, B., T. REICHENAUER, D. KRAFT und F. VALENTA (Herausgeber): *Elevated levels of ozone increase allergen content in pollen of rye (Secale cereale L.)*, Brüssel, 1999. Europ. Acad. Allerg Clin. Immunol. OP 11-97. 1
- [8] JANEWAY, C. und P. TRAVERS: *Immunologie*. Spektrum Akad. Verlag, Berlin, 1995. 2.1.1, 2.1.3
- [9] GULDNER, H.H.: *Genial, aber nicht fehlerfrei: das Immunsystem*. <http://www.regiomed.net/DAH/themes/immsys.htm>, 2001. 2.1.1.1

- [10] JOHANSSON, S. G.: *Raised level of a new immunoglobulin class (IgND) in Asthma*. *Lancet*, 2:951–953, 1967. 2.1.2
- [11] ISHIZAKA, K. und T. ISHIZAKA: *Identification of gamma-E antibodies as a carrier of reaginic activity*. *J. Immunol.*, 99:1187–1198, 1967. 2.1.2
- [12] LEHNINGER, A., D. WILSON und M. COX: *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994. 2.1.2.1, 2.1.2.2
- [13] SCHLIMME, E.: *Biologische Chemie*. Quelle & Meyer, Heidelberg, 1983. 2.1.2.2
- [14] STENESH, J.: *Biochemistry*. Plenum Press, New York, 1998. 2.1.2.2
- [15] ABBAS, A., A. LICHTMANN und J. POBER: *Immunologie*. Hans Huber Verlag, Bern, 1996. 2.1.3, 3.2.1
- [16] LOTTSPEICH, T. und H. ZORBAS: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998. 2.1.4, 3.2.1, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.6
- [17] SEGAL, D., J. D. TAUROG und H. METZGER: *Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:2993–2997, 1977. 2.1.4
- [18] AALBERSE, R.C.: *Structural biology of allergens*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106: 228–238, 2000. 4
- [19] BOUSQUET, J. und P. DERNOLY: *Allergens in 1998: from molecular biology to improved patient care*. *Allergy*, 53:549–551, 1998. 2.1.4.1
- [20] KING, T. P., D. HOFFMANN, H. LOWENSTEIN, D. G. MARSH, T. PLATTS-MILLS und W. THOMAS: *Allergen nomenclature*. *Allergy*, 50:769–774, 1995. 2.1.4.1
- [21] COX, C. S. und C. M. WATHES: *Bioaerosols Handbook*. Lewis, Boca Raton, 1995. 2.1.5
- [22] STANLEY, R. G. und H. F. LINSKENS: *Pollen - Biology and Biochemistry*. Springer Verlag, Berlin, 1974. 2.1.5.1
- [23] BEHRENDT, H. und W.-M. BECKER: *Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors*. *Curr. Op. Immunol.*, 13:709–715, 2001. 2.2
- [24] KNOX, B.: *Pollen and Allergy*, 1979. 2.1.5.1
- [25] PACINI, E.: *Types and meaning of pollen carbohydrate reserves*. *Sex. Plant Reprod.*, 6:362–366, 1996. 2.1.5.1

- [26] SPERANZA, A., G. CALZONI und E. PACINI: *Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharides reserves in mature pollen grains*. Sex. Plant Reprod., 10:110–115, 1997. 2.1.5.1
- [27] MARQUEZ, J., J. SEOANA-CAMBA und M. SUAREZ-CERVERA: *Allergenic and antigenic proteins released in the apertural sporoderm during the activation process in grass pollen grains*. Sex. Plant Reprod., 10:269–278, 1997. 2.1.5.1
- [28] SOLOMON, W.: *Airborne pollen: A brief life*. J. Allergy Clin. Immunol., 109:895–900, 2002. 2.1.5.1
- [29] KNOX, R., C. SUPHIOGLU, P. TAYLOR, R. DESAI, H. WATSON, J. PENG und L. BURSILL: *Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution*. Clin. Exp. Allergy, 27:246–251, 1997. 2.1.5.1
- [30] STANLEY, R. G. und H. LISKENS: *Pollen Biologie, Biochemie, Gewinnung und Verwendung*. Urs Freund Verlag GmbH, Greifenberg, 1985. 2.1.5.1
- [31] TRAVIS, J., T. WHITWORTH, N. MATHESON und D. BAGAROZZI: *Proteinases from pollen and pests*. Acta biochim. pol., 43:411–418, 1996. 2.1.5.1
- [32] HASSIM, Z., S. MARONESE und R. KUMAR: *Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes*. Thorax, 53:368–371, 1998. 2.1.5.1
- [33] PETERSEN, A., K. GROBE, G. SCHRAMM, K. GEHLHAR, S. VIETHS, F. ALTMANN, M. SCHLAAK und W.-M. BECKER: *Structure and function can determine important features in allergenicity: Investigations on the Group 1 allergens of grasses*. Internet symposium on Food Allergens, 95–101:1999, 1. 2.1.5.1, 2.1.6.1
- [34] MAASCH, H. J., W. GEISSLER, H. G. WINTER und R. WAHL: *Quality of Timothy Pollen (*Phleum pratense*) from different pollen seasons and different suppliers*. Int. Arch. Allergy appl. Immun., 81:85–91, 1986. 2.1.5.1
- [35] VITHANAGE, H. und B. KNOX: *Periodicity of Pollen Development and Quantitative Cytochemistry of Exine and Intine Enzymes in the Grasses *Lolium perenne* L. and *Phalaris tuberosa* L.* Ann. Bot., 45:131–141, 1980. 2.1.5.2
- [36] LINSKENS, H. F. und W. JORDE: *The formation of allergens during the development of rye pollen (*secale cereale*)*. Allerg. et immunopath., 35:35–41, 1980. 2.1.5.2

- [37] FORD, S.A. und B.A. BALDO: *A Re-examination of Ryegrass (Lolium perenne) Pollen Allergens*. Int. Arch. appl. Immun., 81:193–203, 1986. 2.1.6, 2.1.6.2
- [38] JOHNSON, P. und D. G. MARSH: *"Isoallergens" from ryegrass pollen*. Nature, 206:935–937, 1965. 2.1.6, 2.1.6.1
- [39] JOHNSON, P. und D. G. MARSH: *Allergens from common rye grass pollen Lolium perenne. I. Chemical composition and structure*. Immunochemistry, 3:91–100, 1966. 2.1.6
- [40] JOHNSON, P. und D. G. MARSH: *Allergens from common rye grass pollen Lolium perenne. II. The allergenic determinants and carbohydrate moiety*. Immunochemistry, 3:101–110, 1966. 2.1.6
- [41] BECKER, W.-M.: *Molekulare Charakterisierung von Allergenen*. Immun. Infekt., 22:82–87, 1994. 2.1.6
- [42] JÄGER, L.: *Characterization of aeroallergens*. Act. Microbiol. Immun. Hung., 45:51–58, 1997. 2.1.6
- [43] HOWLETT, B. und A. CLARKE: *Isolation and partial characterization of two antigenic glycoproteins from rye-grass (Lolium perenne) pollen*. Biochem. J., 197:695–706, 1981. 2.1.6.1, 2.1.6.2
- [44] COTTAM, G., D. MORAN und R. STANDRING: *Physicochemical and immunological characterization of allergenic proteins from rye-grass (Lolium perenne) pollen prepared by a rapid and efficient purification method*. Biochem. J., 234:305–310, 1986. 2.1.6.1
- [45] PEREZ, M., G. ISHIOKA, L. E. WALKER und R. CHESNUT: *cDNA Cloning and Immunological Characterization of the Rye Grass Allergen Lol p 1*. J. Biol. Chem., 265:16210–16215, 1990. 2.1.6.1
- [46] GRIFFITH, I., P. SMITH, J. POLLOK, P. THEERAKULPISUT A. AVJIOGLU, S. DAVIES, T. HOUGH, M. SINGH, R. SIMPSON, L. WARD und B. KNOX: *Cloning and sequencing of Lol p 1, the major allergic protein of rye-grass pollen*. FEBS Letters, 279:210–215, 1991. 2.1.6.1
- [47] KNOX, R. B. und C. SUPHIOGLU: *Pollen allergens: development and function*. Sex. Plant Reprod., 9:318–323, 1996. 2.1.6.1
- [48] PIKE, R., D. BAGAROZZI und J. TRAVIS: *Immunological Cross-reactivity of the major Allergen from Perennial Ryegrass (Lolium perenne, Lol p 1, and the Cystein Proteinase, Bromelain*. Int. Arch. Allergy Immunol., 112:412–414, 1997. 2.1.6.1

- [49] TAMBORINI, E., S. FACCINI, J. LIDHOLM, M. SVENSSON, A. BRANDAZZA, R. LONGHI, H. GROENLUND, A. SIDOLI und P. AROSIO: *Biochemical and immunological recombinant allergen Lol p 1*. Eur. J. Biochem., 249:886–894, 1997. 2.1.6.1
- [50] BARRE, A. und P. ROUGÉ: *Homology modeling of the cellulose-binding domain of a pollen allergen from rye grass: structural basis for the cellulose recognition and associated allergenic properties*. Biochem. Biophys. Res. Com., 296:1346–1351, 2002. 2.1.6.1
- [51] LI, L.-C. und D. COSGROVE: *Grass group 1 pollen allergens( $\beta$ -expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis*. Eur. J. Biochem., 268:4217–4226, 2001. 2.1.6.1
- [52] COSGROVE, D., P. BEDINGER und D. DURACHKO: *Group 1 allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents*. Proc. Acad. Natl. Sci. USA, 94:6559–6564, 1997. 2.1.6.1
- [53] SINGH, M., T. HOUGH, P. THEERAKULPISUT, A. AVJIOGLU, S. DAVIES, P. SMITH, P. TAYLOR, R. SIMPSON, L. WARD, J. MCCLUSKEY, R. PUY und B. KNOX: *Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: Intracellular targeting to the amyloplast*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS), 88:1384–1388, 1991. 2.1.6.2
- [54] BHALLA, P., I. SWOBODA und M. SINGH: *Antisense-mediated silencing of a gene encoding a major ryegrass pollen allergen*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS), 96:11676–11680, 1999. 2.1.6.2
- [55] BHALLA, P., I. SWOBODA und M. SINGH: *Reduction in Allergenicity of Grass Pollen by Genetic Engineering*. Int. Arch. Allergy Immunol., 124:51–54, 2001. 2.1.6.2
- [56] ONG, E., I. GRIFFITH, B. KNOX und M. SINGH: *Cloning of a cDNA encoding a group-V (group-IX) allergen isoform from rye-grass pollen that demonstrates specific antigenic immunoreactivity*. Gene, 134:235–240, 1993. 2.1.6.2
- [57] SUPHIOGLU, C., D. MAWDSLEY, G. SCHÄPPI, S. GRUEHN, M. DE LEON, J. ROLLAND und R. O’HEHIR: *Molecular cloning, expression and immunological characterisation of Lol p 5c, a novel allergen isoform of rye grass pollen demonstrating high IgE reactivity*. FEBS Letters, 462:435–441, 1999. 2.1.6.2
- [58] RAJASHANKAR, K., A. BUFE, W. WEBER, S. ESCHENBURG, B. LINDNER und C. BETZEL: *Structure of the functional domain of the major grass-pollen allergen Phl p 5b*. Acta Cryst. D, 58:1175–1181, 2002. 2.1.6.2

- [59] KLYSNER, S., K. G. WELINDER, H. LOWENSTEIN und F. MATTHIESEN: *Group V allergens in grass pollens: IV. Similarities in amino acid composition and NH<sub>2</sub>-terminal sequences of the group V allergens from Lolium perenne, Poa pratensis and Dactylis glomerata.* Clin. Exp. Allergy, 22:491–497, 1992. 2.1.6.2
- [60] ANSARI, A., P. SHENBAGAMURTHI und D. MARSH: *Complete Amino Acid Sequence of a Lolium perenne (Perennial Rye Grass) Pollen Allergen Lol p II.* J. Biol. Chem., 264:11181–11185, 1989. 2.1.6.2
- [61] SIDOLI, A., E. TAMBORINI, I. GIUTINI, S. LEVI, G. VOLONTE, C. PAINI, C. DE LALLA, A. SICCARDI, F. BARALLE, S. GALLIANI und P. AROSIO: *Cloning, Expression and Immunological Characterization of recombinant Lolium perenne Allergen Lol p II.* J. Biol. Chem., 268:21819–21825, 1993. 2.1.6.2
- [62] FREIDHOFF, L., E. KAUTZKY, J. GRANT, D. MEYERS und D. MARSH: *A study of the human immune response to Lolium perenne (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (rye I and rye II). I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data.* J. Allergy Clin. Immunol., 78:1190–1201, 1986. 2.1.6.2
- [63] ANSARI, A., P. SHENBAGAMURTHI und D. MARSH: *Complete Primary Structure of a Lolium perenne (Perennial Rye Grass) Pollen Allergen, Lol p III: Comparison with known Lol p I and II Sequences.* Biochemistry, 28:8665–8670, 1989. 2.1.6.2
- [64] JAGGI, K.S., A.K. EKRAMODDOULLAH und F. T. KISIL: *Allergenic Fragments of Ryegrass (Lolium perenne) Pollen Allergen Lol p IV.* Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 89:342–348, 1989. 2.1.6.2
- [65] FAHLBUSCH, B., W.-D. MÜLLER, CH. DIENER und L. JÄGER: *Detection of crossreactive determinants in grass pollen extracts using monoclonal antibodies against group IV and group V allergens.* Clin. Exp. Allergy, 23:51–60, 1993. 2.1.6.2
- [66] VANREE, R., D. HOFFMAN, W. VAN DIJK, V. BRODARD, K. MAHIEU, C. KOELEMAN, M. GRANDE, A. VAN LEEUWEN und R. AALBERSE: *Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins.* J. Allergy Clin. Immunol., 95:970–978, 1995. 2.1.6.2
- [67] STEPHENS, E. R., P. HANST, R. DOERR und R. SCOTT: *Reactions of NO<sub>2</sub> and organic compounds in air.* Ind. Eng. Chem., 48:1498–1504, 1956. 2.2.2



- [68] BLIEFERT, C.: *Umweltchemie*. Wiley-VCh., Weinheim, 1997. 2.2.2
- [69] KAPPUS, H.: *Ozon: Das Gesundheitsrisiko ist derzeit nicht zu definieren*. Deut. Ärzteblatt, 95:34–35, 1998. 2.2.2
- [70] FORSTER, J. und J. KUEHR: *The role of ozone*. *Pediatr. Allergy Immun.*, 11:23–25, 2000. 2.2.2
- [71] YU, X., W. POPP und C. WAGNER: *Modulation of bronchial epithelial cell barrier function by in vitro ozone exposure*. *Environ. Health Persp.*, 102:1068–1072, 1994. 2.2.2
- [72] JÖRRES, R., D. NOVAK und H. MAGNUSSEN: *The effect of ozone exposure on allergen responsiveness in subjects with asthma or rhinitis*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 153:56–64, 1996. 2.2.2
- [73] MOLFINO, N., S. WRIGHT und I. KATZ: *Effect of low concentration of ozone in inhaled allergen responses in asthmatic subjects*. *Lancet*, 338:199–203, 1991. 2.2.2
- [74] MEYER, U.: *Untersuchungen zur Ozonsensitivität von Photosynthese, Assimilation und Ertrag bei Weizen (*Triticum aestivum* L.) und bei Rapspflanzen (*Brassica napus* L.) definierter Entwicklungsstadien*. Dissertation, Köln, 1999. 2.2.3, 3.1.1
- [75] TRESHOW, M. und F. ANDERSON: *Plant stress from air pollution*. John Wiley and Sons, Chichester, 1989. 2.2.3
- [76] SELLDEN, G. und H. PLEIJEL: *Photochemical oxidant effects on vegetation - response in relation to plant strategy*. *Water, Air & Soil Pollution*, 85:111–122, 1995. 2.2.3.1
- [77] URBACH, W., W. SCHMIDT, J. KOLBOWSKI, S. RUEMMELE, E. REISBERG, W. STEIGNER und U. SCHREIBER: *Effects of environmental pollutants on photosynthesis and cell membranes of plants*. GSF-Bericht Statusseminar Waldschäden, ISSN: 0721-1694:195–206, 1989. 2.2.3.1
- [78] MEYER, U., B. KÖLLNER, J. WILLENBRINK und G. KRAUSE: *Physiological changes on agricultural crops induced by different ambient ozone exposure regimes: 1. Effects on photosynthesis and assimilate allocation in spring wheat*. *New Phytol.*, 136:645–652, 1997. 2.2.3.1
- [79] TOKARSKA-SCHLATTNER, M., A. FINK, F. CASTILLO, P. CRESPI, M. CREVECOEUR, H. GREPPIN und P. TACCHINI: *Effects of ozone on the plasma membrane proteins in *Arabidopsis thaliana* (L.) leaves*. *Plant, Cell Environ.*, 20:1205–1211, 1997. 2.2.3.1

- [80] SCHRAUDNER, M., C. LANGEBARTELS und H. SANDERMANN: *Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone*. *Physiol. Plant.*, 100:274–280, 1997. 2.2.3.1
- [81] LARSON, R. A.: *Plant defenses against oxidative stress*. *Arch. Insect Biochem. Phys.*, 29:175–186, 1995. 2.2.3.1
- [82] HIPPELI, S. und E. ELSTNER: *Mechanism of Oxygen Activation during plant stress: Biochemical Effects of Air pollutants*. *J. Plant Physiol.*, 148:249–267, 1996. 2.2.3.1
- [83] SCHNEIDERBAUER, A., E. BACK, H. SANDERMANN und D. ERNST: *Ozone induction of extensin mRNA in Scots pine, Norway spruce and European beech*. *New Phyt.*, 130:225–230, 1995. 2.2.3.1
- [84] PELL, E., P. TEMPLE, A. FRIEND, H. MOONEY und W. WINNER: *Compensation as a Plant Response to Ozone and Associated Stresses: An Analysis of ROPIS Experiments*. *J. Environ. Qual.*, 23:429–436, 1994. 2.2.3.1
- [85] YIN, Z.-H., C. LANGEBARTLES und H. SANDERMANN: *Specific induction of ethylen biosynthesis in tobacco plants by the air-pollutant ozone*. *Proc. Royal Soc. Edinb.*, 102:127–130, 1994. 2.2.3.1
- [86] MORGAN, P. und M. DREW: *Ethylene and plant responses to stress*. *Phys. Plant.*, 100:620–630, 1997. 2.2.3.1
- [87] TINGEY, D., C. STANDLEY und R. FIELD: *Stress ethylene evolution: a measure of ozone effects on plants*. *Athm. Env.*, 10:969–974, 1976. 2.2.3.1
- [88] ECKEY-KALTENBACH, H., D. ERNST, W. HELLER und H. SANDERMANN: *Biochemical plant response to ozone 1*. *Plant Physiol.*, 104:67–74, 1994. 2.2.3.1
- [89] ERNST, D., M. SCHRAUDNER, C. LANGEBARTELS und H. SANDERMANN: *Ozone-induced changes of mRNA levels of  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase as 'pathogenesis-relates' protein 1b in tobacco plants*. *Plant Molec. Biol.*, 20:673–682, 1992. 2.2.3.1
- [90] SCHRAUDNER, M., U. GRAF, C. LANGEBARTELS und H. SANDERMANN: *Ambient ozone can induce plant defence reactions in tobacco*. *Proc. Royal Soc. Edinb.*, 102:55–61, 1994. 2.2.3.1
- [91] SCHRAUDNER, M., C. LANGEBARTELS und H. SANDERMANN: *Plant defence systems and ozone*. *Biochem. Soc. Trans.*, 24:456–461, 1996. 2.2.3.1

- [92] SCHRAUDNER, M., D. ERNST, C. LANGEBARTELS und H. SANDERMANN: *Biochemical plant responses to ozone*. Plant Physiol., 99:1321–1329, 1992. 2.2.3.1
- [93] SANDERMANN, H.: *Ozone and plant health*. Annu. Rev. Phytopathol., 34:347–66, 1996. 2.2.3.1
- [94] KANGASJÄRVI, J., J. TALVINEN, M. ULTRIAINEN und R. KARJALAINEN: *Plant defence systems induced by ozone*. Plant Cell Environ., 17:783–794, 1994. 2.2.3.1
- [95] HELANDER, M., J. SAVOLAINEN und J. AHLHOLM: *Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens*. Allergy, 52:1207–1214, 1997. 2.2.3.1
- [96] WELLBURN, F. und A. WELLBURN: *Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections*. Plant Cell Environ., 19:754–760, 1996. 2.2.3.1
- [97] ELKIEY, T. und P. ORMOND: *Response of turfgrass cultivars to ozone, sulfur dioxide, nitrogen dioxide or their mixture*. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 105:664–668, 1980. 2.2.4
- [98] BENNET, J. und V. RONECKLES: *Effects of low levels of ozone on the growth of crimson clover and annual ryegrass*. Crop science, 17:443–445, 1977. 2.2.4
- [99] BLACK, V., C. BLACK, J. ROBERTS und C. STEWART: *Impact of ozone on the reproductive development of plants*. New Phytol., 147:421–447, 2000. 2.2.5
- [100] EMBERLIN, J.: *Interaction between air pollutants and aeroallergens*. Clin. Exp. Allergy, 25:33–39, 1995. 2.2.5
- [101] MUMFORD, R., H. LIPKE und D. LAUFER: *Ozone-induced changes in Corn Pollen*. Environ. Sci. Tec., 6:427–430, 1972. 2.2.5
- [102] PELTRE, G., L. DEROUET und M. CERCEAU-LARRIVAL: *Model treatments simulating environmental action on allergic Dactylus glomerata pollen*. Grana, 30:59–61, 1991. 2.2.5
- [103] HARRISON, B. und W. FEDER: *Ultrastructural changes in pollen exposed to ozone*. Phytopat. Notes, 64:257–258, 1974. 2.2.5

- [104] MASUCH, G., J.-TH. FRANZ, K. SCHOENE, H. MÜSKEN, K.-CH. BERGMANN und R. WAHL: *Wirkung von Ozon auf den Gehalt an Gruppe 5 Allergen in Pollen von Lolium perenne*. Allergo J. (SA), 5:28, 1996. 2.2.6.1
- [105] MASUCH, G., J.-TH. FRANZ, K. SCHOENE, H. MÜSKENS und K.-CH. BERGMANN: *Ozone increases group 5 allergen content of Lolium perenne*. Allergy (Allergynet), 8:874–876, 1997. 2.2.6.1
- [106] MASUCH, G., U. DEPPE, K. SCHOENE, J.-TH. FRANZ, H. MÜSKEN und K.-CH. BERGMANN: *The effect of ozone on Pl p 5 content of rye grass pollen*. Allergo J., (in Druck). 2.2.6.1
- [107] SCHOENE, K., G. MASUCH und J.-TH. FRANZ: *The effect of ozone on pollen development in Lolium perenne L. cv. Livree*. <http://chemie.uni-paderborn.de/arbeitskreise/biologie/WWW/Forschung/JTFa/index-128.html>. 2.5
- [108] MASUCH, G., J.-TH. FRANZ, K. SCHOENE, H. MÜSKEN und K.-CH. BERGMANN: *Einfluß von Ozon auf histologische Strukturen in Pollen und Pflanzenbestandteilen von Lolium perenne*. 4. Europäisches Pollenflugsymposium, Seiten 12–13, 1997. 2.2.6.2
- [109] LALONDE, S., D. BEEBE und S. HARGURDEEP: *Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit*. Sex. Plant Reprod., 10:40–48, 1997. 2.2.6.2
- [110] ECKERT, W.A. und J. KARTENBECK: *Proteine: Standardmethoden der Molecular- und Zellbiologie*. Springer Verlag, Berlin. 3.2.1, 3.2.5
- [111] KEMENY, D. M.: *ELISA*. J. Fischer Verlag. 3.2.1
- [112] BRADFORD, M. M.: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 72:248–254, 1976. 3.2.2.1
- [113] LOWRY, O. H.: *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 193:265–275, 1951. 3.2.2.2
- [114] HOLTZHAUER, M.: *Methoden in der Proteinanalytik*. Springer Verlag, Berlin, 1996. 3.2.2.2
- [115] LANDERS, J. P.: *Handbook of Capillary electrophoresis*. CRC-Press, Boca Raton, 1997. 3.2.4.3
- [116] PACAKOVA, V., J. PECHANCOVA und K. STULIK: *Capillary electrophoresis in Allergen Preparation Research and in Production Control*. J. High Resol. Chromatogr., 18:582–586, 1995. 3.2.4.3

- [117] BESLER, M.: *Kapillarelektrophoretische Untersuchungen der Allergene des Hühnereiklars und Epitopstudien von Ovomuroid (Gal d1)*. Doktorarbeit, Universität Hamburg, 1998. 3.2.4.3
- [118] CHEN, H.-D., C.-L. CHEN, S. HUANG, H. KUNG und H. CHEN: *Characterization of latex allergenic components by capillary zone electrophoresis and N-terminal sequence analysis*. J. Biomed. Sci., 5:421–427, 1998. 3.2.4.3
- [119] RENART, J., J. REISER und G. STARK: *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3116–20, 1979. 3.2.6
- [120] HESSE, M., H. MEIER und B. ZEEH: *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991. 3.2.7
- [121] MIYAZAWA, T., T. SHIMANOUCI und S. MIZUSHIMA: *Normal vibrations of N-methylacetamide*. J. Chem. Phys., 29:611–616, 1958. 3.2.7
- [122] NAUMANN, D.: *Infrared spectroscopy in Microbiology*. In: MEYERS, R.A. (Herausgeber): *Encyclopedia of Analytical chemistry*, Seiten 102–131. John Wiley & Sons, Chichester, 2000. 3.1
- [123] LASCH, P.: *Computergestützte Bildrekonstruktion auf Basis FTIR-mikroskopischer Daten humaner Tumoren*. Doktorarbeit, Robert-Koch-Institut Berlin, 33. 3.2.7.1
- [124] BRUKER ANALYTICAL GMBH: *Charakterisierung von Mikroorganismen mit dem IFS 28/B*. 3.2.7.1
- [125] GROTE, M., S. VRTALA, V. NIEDERBERGER, R. VALENTA und R. REICHEL: *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., 105:1140–1145, 2000. 3.2.8
- [126] MAASCH, H. J., W. GEISSLER, G. WINTER und R. WAHL: *Untersuchungen zum Einfluß der Extraktionszeiten auf den Gehalt von Inhaltsstoffen von 6 Gräserpollenextrakten*. Allergologie, 7:209–215, 1984. 3.2.8
- [127] ENTRUP, E. LÜTKE und G. MICHELMANN: *Gräser bestimmen und erkennen*. Eigenverlag DSV-Deutsche Saatveredelung, Lippstadt, 1998. 3.3.0.3
- [128] FAHLBUSCH, B., W.-D. MÜLLER, O. RUDESCHKO und B. WEBER: *Quantifizierung von Gruppe-1- und Gruppe-5-Allergenen in Gräserpollenextrakten verschiedener Grasspezies*. Allergologie, 22:460–466, 1999. 4.1.3

- [129] SCHÄPPI, G. F., P. TAYLOR, M. PAIN, P. CAMERON, A. W. DENT, A. STAFF und C. SUPHIOGLU: *Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma suffers sensitized to grass pollen allergens*. Clin. Exp. Allergy, 29:633–641, 1999. 4.1.3
- [130] PARADIES, H. mündl. Mitteilung. 4.4.1