

Diplomarbeit

**DER EINFLUSS VON POLLENPROTEASEN AUF
HUMANE BINDEHAUTZELLKULTUREN**

eingereicht von

Eva-Maria Spreitzhofer

Mat.Nr.: 0211461

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Augenheilkunde

Auenbruggerplatz 4, A-8036 Graz, Austria

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Mag. Dr. phil. Otto Schmut

Graz, Januar 2009

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, Januar 2009

Vorwort

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit – vor allem in Hinblick auf die Vermeidung einer ausufernden Verwendung von Pronomen – habe ich mich dazu entschlossen, alle geschlechtsbezogenen Wörter nur in eingeschlechtlicher Form – der deutschen Sprache gemäß zumeist die männliche – zu verwenden. Selbstredend gelten alle Bezeichnungen gleichwertig für Frauen.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Allen voran danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Otto Schmut, der mir von der Themenwahl bis hin zur Begutachtung und Beurteilung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Weiters gilt mein Dank dem Laborteam, insbesondere BA Gabriele Trummer und BA Christine Wachswender, die mir die praktische Anwendung biochemischer Methoden näher brachten und ohne deren Einsatz diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre.

Ebenfalls danke ich Frau Univ.-Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Doris Lang-Loidolt für die Zweitbetreuung.

Nicht zuletzt bin ich auch Klinikvorstand Herrn Univ.-Prof. Dr. Andreas Wedrich für die Benutzung des Labors zu Dank verpflichtet.

Abschließend möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden für den emotionalen Rückhalt danken.

Zusammenfassung

Hintergrund: Während der Pollenflugsaison wird das Auftreten allergieähnlicher Symptome auch bei Nicht-Allergikern zunehmend häufiger beobachtet. Ursächlich für diese saisonale nicht-allergische (Rhino-) Konjunktivitis [SNA(R)K] könnten die in Pollen enthaltenen Proteasen sein. Unlängst gelang der Nachweis, dass diese Enzyme imstande sind, die in menschlicher Tränenflüssigkeit enthaltenen Proteine zu zerstören. Folglich wird der Tränenfilm instabil und es bilden sich trockene Stellen an der Augenoberfläche. Da auch die Augenbindehaut Pollen ausgesetzt ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch sie proteolytisch geschädigt wird, wodurch okuläre Reizzustände und Entzündungsreaktionen auftreten.

Methoden: Humane, kultivierte Bindehautzellen, sog. CHANG-Zellen, wurden mit Extrakten aus Birkenpollen inkubiert. Der Aktivitätsnachweis der in den Pollen enthaltenen Proteasen erfolgte durch Zymographie. Zytomorphologische Veränderungen wurden mit dem CASY1 Cell Counter analysiert. Mittels MTS-Test und anschließender Auswertung durch einen ELISA-Reader konnte die Zellvitalität bzw. die Zytotoxizität quantifiziert werden. Die Vitalität der mit Pollenextrakt inkubierten Zellen wurde mit jener der Kontrollzellen verglichen und statistisch ausgewertet.

Resultate: Die Inkubation von CHANG-Zellen mit Birkenpollenextrakt führt in Abhängigkeit von Pollenextraktkonzentration und Einwirkzeit zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Zellvitalität.

Schlussfolgerungen: Die Zellschädigung durch Pollenproteasen erklärt die bei Nicht-Allergikern immer häufiger auftretenden Reizerscheinungen an der Bindehaut, die einer allergischen Reaktion sehr ähnlich sind. Aber erst bei einem Mangel an Antiproteasen, wie er z.B. beim Syndrom des Trockenen Auges auftritt, kann die schädigende Wirkung der Pollenproteasen einsetzen. Dies erklärt, warum die durch Pollenproteasen vermittelte Reaktion nicht bei allen Menschen auftritt. Verständlich ist auch, dass Antiallergika bei SNAK-Patienten wirkungslos sein müssen, da Allergien ganz andere Reaktionswege aufweisen, als die Pollenproteasen-Reaktion beim SNAK-Syndrom.

Schlüsselwörter: Pollenproteasen, Bindehautzellen, SNAK-Syndrom

Abstract

Background: During pollen seasons allergy-like symptoms can also be observed in non-allergic persons more frequently. The reason for this non-allergic (rhino-) conjunctivitis [SNA(R)C] may be proteases, that are contained in pollen. Recently it has been proven that these enzymes are able to destroy proteins in human tears. Therefore, the tear film becomes instable and dry sites on the ocular surface appear. Due to the fact that the conjunctiva is also exposed to pollen it is obvious that the conjunctiva becomes affected too whereby ocular irritations and inflammatory reactions occur.

Methods: Human cultivated conjunctival cells, so called CHANG-cells, were incubated with extracts of birch pollen. Zymography was carried out in order to investigate the proteolytic activity of these pollen. Cytomorphological changes were analysed using the CASY1 Cell Counter. Via MTS-assay and following evaluation with an ELISA-reader the cell vitality, respectively the cytotoxicity, was quantified. The vitality of the cells, which were incubated with pollen extract, was compared with the vitality of the control cells and the results were statistically evaluated.

Results: Depending on the pollen extract concentration and the incubation period the treatment of CHANG-cells with pollen extract of birch induces a statistically significant decrease of the cell vitality.

Conclusion: The cell damage caused by pollen proteases defines the allergy-like irritations of the conjunctiva, that can also be observed in non-allergic persons more frequently. However, there is a lack of antiproteases, which can be found within the dry eye syndrome for example, pollen proteases become capable of unfolding their destructive effects. This fact declares why not everybody is affected by this reaction mediated by pollen proteases. It is also perspicuous that antiallergic drugs are ineffective in SNAC-patients, because allergies have completely different reaction pathways versus the pollen protease reaction within the SNAC-syndrome.

Key words: pollen proteases, conjunctival cells, SNAC-syndrome

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Physiologie der Augenoberfläche	2
1.1.1	Der Tränenfilm.....	2
1.1.2	Die Hornhaut (Kornea)	3
1.1.3	Die Bindehaut (Konjunktiva)	5
1.2	Pollenproteasen und ihre Rolle im Rahmen der pflanzlichen Befruchtung	8
2	Material und Methoden	12
2.1	Pollen	12
2.1.1	Sammlung	12
2.1.2	Pollenextrakte.....	12
2.1.3	Zymographie	13
2.2	Bindehautzellkultur	15
2.2.1	CHANG-Zellen.....	15
2.2.2	Kultivierung.....	15
2.2.3	Zellsuspension.....	16
2.2.4	Zellanalyse mittels dem CASY1 Cell Counter	16
2.2.5	Aussaat	17
2.3	Inkubation der CHANG-Zellen mit Birkenpollenextrakt	18
2.4	Zellvitalitätsmessung mittels MTS-Test	19
2.4.1	Beschreibung	19
2.4.2	Durchführung.....	19
2.5	Statistische Datenauswertung	20

3	Resultate	21
3.1	Mikroskopische Analyse der CHANG-Zellen nach Inkubation mit Birkenpollenextrakt	21
3.2	Zymographie	23
3.3	CASY1 - Zellanalyse	24
3.4	MTS-Testresultate.....	28
3.5	Statistische Datenauswertung	32
4	Diskussion	33
4.1	Einfluss von Pollenproteasen auf die Augenoberfläche	33
4.1.1	Einfluss von Pollenproteasen auf den Tränenfilm.....	33
4.1.2	Einfluss von Pollenproteasen auf das okuläre Oberflächenepithel.....	34
4.1.3	Antiproteasen – Physiologische Schutzfaktoren.....	36
4.2	Pollenproteasen zerstören Tight junctions	36
4.3	Allergische Pollen-Reaktion versus nicht-allergische Pollenproteasen- Reaktion.....	38
4.4	Therapieansätze	40
5	Literaturverzeichnis	42

Abkürzungen

APC:	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.:	Aqua destillata
°C:	Grad Celsius
cm ² :	Quadratcentimeter
CO ₂ :	Kohlenstoffdioxid
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DPBS:	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FBS:	Fetal Bovine Serum
g:	Gramm
IgE:	Immunglobulin E
IL-4:	Interleukin-4
kDa:	Kilodalton
mg:	Milligramm
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
MTS:	3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
nm:	Nanometer
PAF:	Plättchen-aktivierender Faktor
P/S:	Penicillin / Streptomycin
SDS-PAGE:	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
U/min:	Umdrehungen pro Minute

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Dreischichtiger Aufbau des Tränenfilms. Modifiziert nach:

<http://www.drimalcolmmckellar.co.nz/dry-eye/what-is-it.html>. Bezogen am 29. Dez. 2008

Abbildung 2: Fünfschichtiger Aufbau der Kornea. Modifiziert nach:

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/eye/eye.htm>. Bezogen am 29. Dez. 2008

Abbildung 3: Anatomischer Aufbau der Konjunktiva. Übernommen aus: Sachsenweger M. Augenheilkunde. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003; p.73

Abbildung 4: Histologischer Aufbau der Konjunktiva bulbi. Modifiziert nach: Spalton DJ. Atlas of clinical ophthalmology. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005; p.65

Abbildung 5: Nicht verhornendes Plattenepithel der Konjunktiva bulbi mit Becherzellen. Modifiziert nach: Spalton DJ. Atlas of clinical ophthalmology. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005; p.65

Abbildung 6: Befruchtung bei Bedecktsamern (Angiospermae). Modifiziert nach: Z. prakt. Augenheilkd. 2009 in Druck

Abbildung 7: Männliche Blütenstände der Birke. Verfügbar unter:

http://www.baumkunde.de/pics/gr/0274pic_bluete_gr.jpg. Bezogen am 11.01.2009

Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines männlichen Blütenstands der Birke mit Pollen. Zur Verfügung gestellt von: Ass.-Prof. Dr. Karl Ettinger, Institut für Erdwissenschaften, Karl-Franzens Universität Graz

Abbildung 9: Elektrophoresekammer. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskop. Zur Verfügung gestellt von: Dieter Franz Rabensteiner und Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 11: CASY1 Cell Counter. Zur Verfügung gestellt von: Dieter Franz Rabensteiner und Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 12: Zellaussaat auf 96-Well-Platten mit einer Multikanalpipette (Eppendorf Research®, Hamburg, Deutschland). Zur Verfügung gestellt von: Dieter Franz Rabensteiner und Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 13: ELISA-Mikroplatten-Lesegerät. Zur Verfügung gestellt von: Dieter Franz Rabensteiner und Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 14: Kontrolle, CHANG-Zellen ohne Behandlung mit Pollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 15: CHANG-Zellen nach 5 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 16: CHANG-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 17: Zymogramm: Bahnen 1 – 6 Birkenpollen, Bahn 7 leer, Bahnen 8 und 9 Knäuelgraspollen. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 18: Abnahme der Zellzahl nach Inkubation der CHANG-Zellen

mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 19: Veränderung des mittleren Zelldurchmessers nach Inkubation

mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 20: Veränderung des mittleren Zellvolumens nach Inkubation

mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 21: CASY1-Analyse: Kontrolle. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 22: CASY1-Analyse: CHANG-Zellen nach 5 Stunden Inkubation. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 23: CASY1-Analyse: CHANG-Zellen nach 24 Stunden Inkubation. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 24: MTS-Test nach 5 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Pollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 25: MTS-Test nach 24 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Pollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 26: Zellvitalität nach Inkubation mit 5 mg/ml Pollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 27: Zellvitalität nach Inkubation mit 25 mg/ml Pollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 28: Ergebnisse der statistischen Datenauswertung mit SPSS. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinische Universität Graz

Abbildung 29: Pollen in trockenem Zustand. Zur Verfügung gestellt von: Dieter Franz Rabensteiner, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 30: Pollen nach Flüssigkeitszugabe. Zur Verfügung gestellt von: Dieter Franz Rabensteiner, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Pollens mit Poren. Zur Verfügung gestellt von: Ass.-Prof. Dr. Karl Ettinger, Institut für Erdwissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz

Abbildung 32: PAGE von Nasensekret (re.), Haselpollenextrakt (li.) und einer Mischung beider (Mitte). Die Pfeile deuten auf jene Proteine, die durch Pollenproteasen zerstört wurden. Zur Verfügung gestellt von: Dr. H. Wolf, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Abbildung 33: Gereiztes Auge nach Pollenexposition. Verfügbar unter: <http://www.drkronwith.com/redeye.jpg>. Bezogen am 15. Jan. 2009

Abbildung 34: Allergische Pollen-Reaktion versus nicht-allergische Pollenproteasen-Reaktion. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema einer 96-Well-Platte: A = Aqua bidest, B = Blank, BP = Blank und Pollenextrakt, K = Kontrolle (Zellen), P = Probe (Zellen und Pollenextrakt). Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Tabelle 2: Extinktionswerte nach 5 Stunden Inkubation mit 5 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Tabelle 3: Extinktionswerte nach 24 Stunden Inkubation mit 5 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Tabelle 4: Extinktionswerte nach 5 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

Tabelle 5: Extinktionswerte nach 24 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt. Von: Eva-Maria Spreitzhofer, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Medizinischen Universität Graz

1 Einleitung

In der Pollenflugsaison leiden viele Menschen an geröteten, tränenden, juckenden oder verklebten Augen sowie an einer rinnenden oder verstopften Nase. Auch das Syndrom des Trockenen Auges kann durch Pollen hervorgerufen bzw. verstärkt werden. Häufig werden diese Reaktionen auf Pollen auch bei Nicht-Allergikern beobachtet, weshalb man hierbei auch von saisonaler nicht-allergischer (Rhino-) Konjunktivitis [SNA(R)K] sprechen kann. Ursächlich hierfür sind die in Pollen enthaltenen Proteasen – Enzyme, die Proteine hydrolytisch spalten.

Unlängst durchgeführte Studien zur Untersuchung der Wirkung von Pollen auf den Tränenfilm zeigten, dass Pollenproteasen imstande sind, die in der Tränenflüssigkeit enthaltenen Proteine zu zerstören, wodurch der Tränenfilm instabil wird. Im Zuge dessen kommt es zur Ausbildung von trockenen Stellen an der Augenoberfläche, die mit dem Auftreten von okulären Reizerscheinungen und entzündlichen Reaktionen einhergehen. Diese nicht-allergische Reaktion kann in ähnlicher Weise auch bei Kontakt von Pollen mit Nasensekret beobachtet werden.

Da Bindehautzellen ebenso Pollen ausgesetzt sind, liegt die Vermutung nahe, dass auch sie durch Pollenproteasen direkt geschädigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird mittels biochemischer Methoden der Einfluss von Pollenproteasen in Form von Pollenextrakten auf humane Bindehautzellkulturen untersucht. Aus den Ergebnissen erhofft man sich Rückschlüsse auf in-vivo-Vorgänge am pollenexponierten Auge ziehen zu können. Dies stellt eine wichtige Grundlage zur Entwicklung von Medikamenten gegen die proteasenvermittelte Reaktion dar.

Zunächst sollen jedoch einige essentielle Grundlagen besprochen werden, die hier nachfolgend dargestellt sind.

1.1 Anatomie und Physiologie der Augenoberfläche

1.1.1 Der Tränenfilm

Der präokuläre Film wirkt als vorderste optische Oberfläche des Auges und gleicht Unregelmäßigkeiten an Horn- und Bindehaut aus. Zudem dient er der Reinigung, Hydratation und Sauerstoffversorgung der Hornhaut und besitzt auch antibakterielle und immunologische Eigenschaften. Er ist somit wesentlich an Schutz und Regeneration des Horn- und Bindehautepithels beteiligt [1].

Der Tränenfilm ist 7-10 μm dick und weist eine dreischichtige Struktur auf (Abbildung 1) [1].

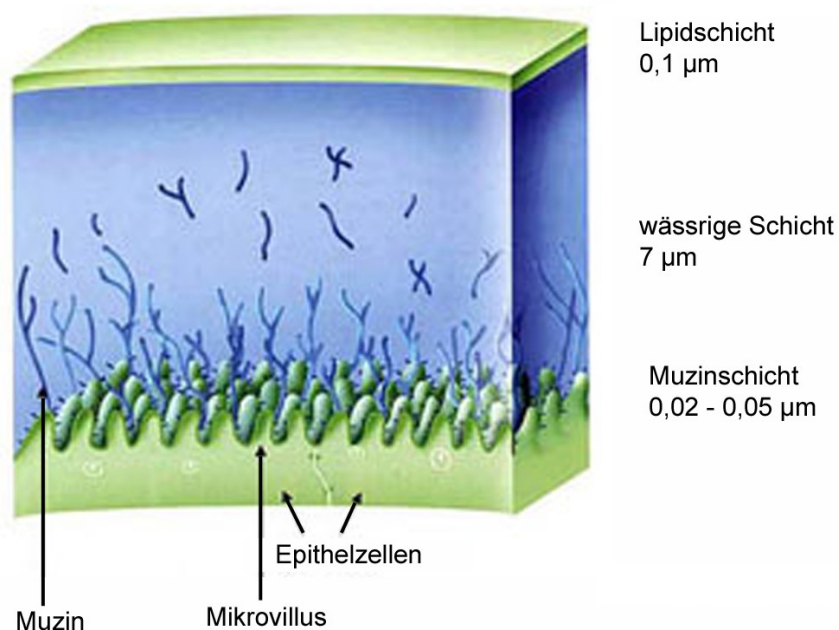


Abbildung 1: Dreischichtiger Aufbau des Tränenfilms

Das Epithel von Horn- und Bindehaut wird überzogen von einer dünnen ($0,02 - 0,05 \mu\text{m}$) Muzinschicht aus überwiegend Glykoproteinen, die von Becherzellen der Bindehaut wie auch von den Oberflächenepithelien sezerniert werden. Diese innerste Schicht sowie die glykokalixähnliche Oberflächenstruktur der Epithelien selbst sind für die Adhäsion des Tränenfilms an der okulären Oberfläche verantwortlich [1].

Daran schließt sich ohne scharfe Begrenzung eine dicke (7 µm) wässrige Schicht an. Sie wird von den Haupt- und akzessorischen Tränendrüsen sezerniert und enthält neben Stoffwechselmetaboliten (z.B. Laktat, Glukose, Harnstoff) auch Vitamine und eine Reihe von Proteinen. Zu letzteren zählen das mengenmäßig überwiegende tränenspezifische Präalbumin sowie Glykoproteine, Enzyme (z.B. Peroxydasen, lysosomale Hydrolasen, Serinproteasen, Antiproteasen), Zytokine (z.B. epidermaler Wachstumsfaktor) und auch Proteine mit immunologischer Abwehrfunktion (z.B. Immunglobuline, Komplement, Laktoferrin, Lysozym). Als Transportmedium der in dieser wässrigen Schicht gelösten Stoffe dient diese der Ernährung und Entsorgung sowie dem Schutz und der Regeneration von Horn- und Bindehaut [1].

Den Abschluss nach außen bildet eine dünne (0,1 µm) Lipidschicht aus Wachs- und Cholesterinestern sowie polaren Lipiden, die vorwiegend von Meibomschen Drüsen, in geringerem Ausmaß auch von Zeisschen und Mollischen Drüsen, gebildet werden. Die Lipidschicht vermindert die Verdunstung von Tränenflüssigkeit und ist somit für die Stabilität des Tränenfilms verantwortlich [1].

Jeder Lidschlag geht mit einem Neuaufbau des Tränenfilms einher, indem bei Lidschluss die Lipidschicht komprimiert und beim Öffnen des Lides wieder gleichmäßig über die Augenoberfläche verteilt wird. Im Intervall zwischen zwei Lidschlägen kommt es durch Verdunstung und Abfluss über die ableitenden Tränenwege zu einem partiellen Verlust an Tränenflüssigkeit. Dünnt der Tränenfilm dabei dermaßen aus, dass Muzin- und Lipidschicht miteinander in Kontakt treten, reißt der Tränenfilm auf und es bilden sich trockene Stellen an der Augenoberfläche, die mit okulären Reizerscheinungen einhergehen können [1, 2].

1.1.2 Die Hornhaut (Kornea)

Die Hornhaut bildet den transparenten vorderen Teil des Augapfels und ist mit ca. 43 Dioptrien wesentlich an der Gesamtbrechkraft des Auges beteiligt. Sie ist uhrglasförmig in die Lederhaut eingesetzt. Der in die Sklera übergehende Rand wird als Limbus corneae bezeichnet, wo oberflächlich auch die Bindehaut inseriert. Die Dicke der Kornea nimmt von zentral (0,52 mm) nach peripher (0,65 mm) zu. Ihr Durchmesser beträgt beim Erwachsenen 10-12 mm und beim Neugeborenen 8-10 mm [3, 4, 5].

Histologisch besteht die Kornea aus fünf Schichten (Abbildung 2) [3].

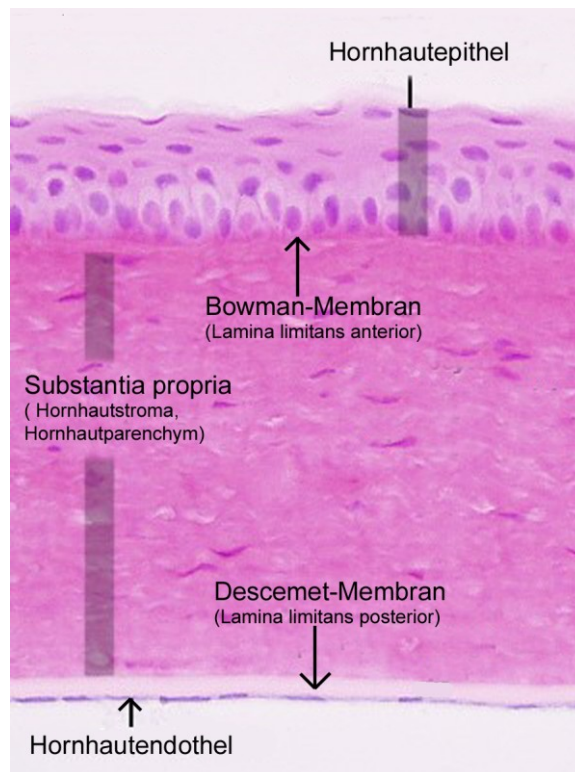


Abbildung 2: Fünfschichtiger Aufbau der Kornea

Die Hornhautoberfläche bildet ein mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel, das als Barriere gegen Infektionen, eindringende Tränenflüssigkeit und Fremdstoffe fungiert. Die basalen Zellen sitzen einer verdickten, nicht regenerationsfähigen Basalmembran, der Bowman-Membran (Lamina limitans anterior), auf. Daran schließt sich die Substantia propria an, die aus Keratozyten und miteinander verwobenen kollagenen Fibrillen besteht. Dazwischen sind Proteoglykane eingelagert, die für die reguläre Schichtung und Dehydratation der Hornhaut sorgen, wodurch die Transparenz des Gewebes gewährleistet wird. Das bradytrophe Hornhautstroma ist gefäßfrei und regeneriert nur langsam unter Narbenbildung. Nach innen wird das Parenchym von der elastischen und regenerationsfähigen Descemet-Membran (Lamina limitans posterior) begrenzt. Den Abschluss bildet das einschichtige Hornhautendothel, das für den Stoffaustausch zwischen Kornea und Kammerwasser verantwortlich ist und eine Diffusionsbarriere für das Kammerwasser darstellt [3].

Da die Kornea selbst gefäßfrei ist, erfolgt die Ernährung über das Kammerwasser, die Tränenflüssigkeit und über das Randschlingennetz der Bindehautgefäße. Die Hornhaut ist hochsensibel innerviert und mit ausgeprägten Schutzreflexen ausgestattet [3].

1.1.3 Die Bindehaut (Konjunktiva)

Die Augenbindehaut liegt als *Conjunctiva bulbi* der Sklera verschieblich auf (Abbildung 3). Sie erstreckt sich vom *Limbus corneae* zum oberen und unteren *Fornix conjunctivae*, wo sie in die *Conjunctiva tarsi* übergeht. Diese überzieht die Innenseite der Lider und ist fest mit dem Tarsus verbunden [3, 4, 5].

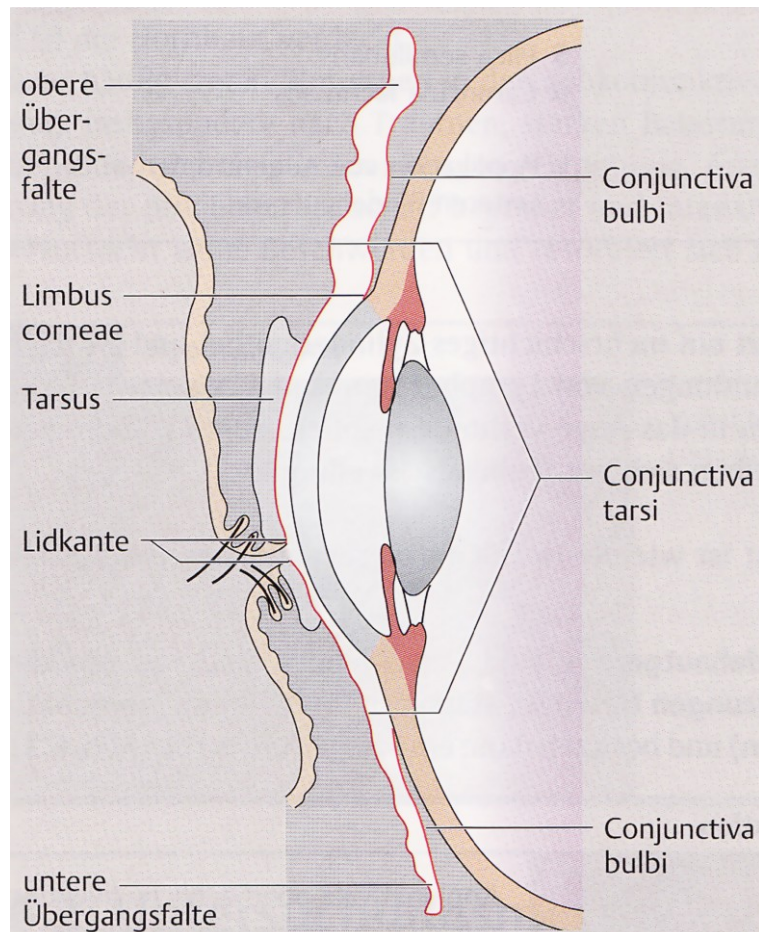


Abbildung 3: Anatomischer Aufbau der Konjunktiva

Im inneren Lidwinkel liegt die Plica semilunaris, eine Schleimhautduplikatur, die als Rudiment der Nickhaut angesehen wird. Nasal davon befindet sich ein kleiner Schleimhauthöcker, die Caruncula lacrimalis, die vereinzelt Härchen und Drüsen aufweist [3, 4, 5].

Die Conjunctiva bulbi besitzt ein mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel. Dieses ist reich an Becherzellen, deren muzinöses Sekret einen wesentlichen Bestandteil des Tränenfilms darstellt [3] (Abbildungen 4 und 5).

Die Conjunctiva tarsi trägt hingegen ein mehrschichtiges Zylinderepithel und weist follikelähnliche Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen auf, die der lokalen Immunabwehr dienen [3].

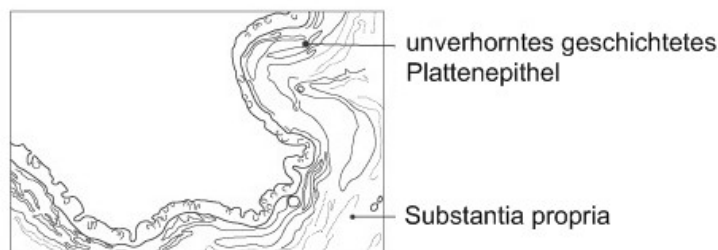
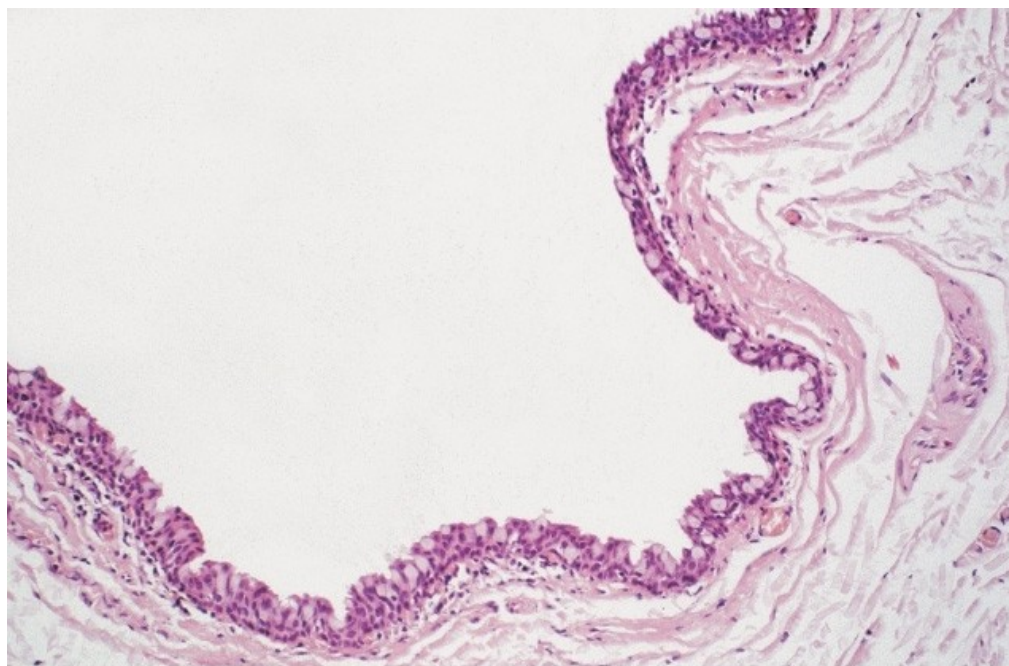


Abbildung 4: Histologischer Aufbau der Konjunktiva bulbi

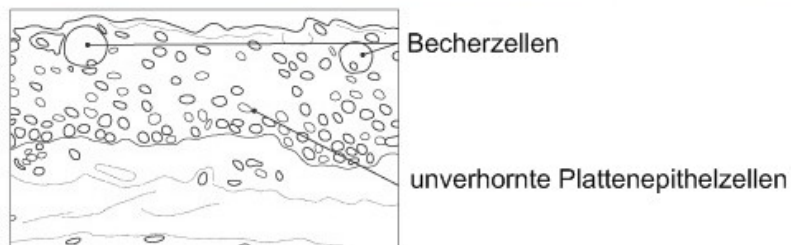
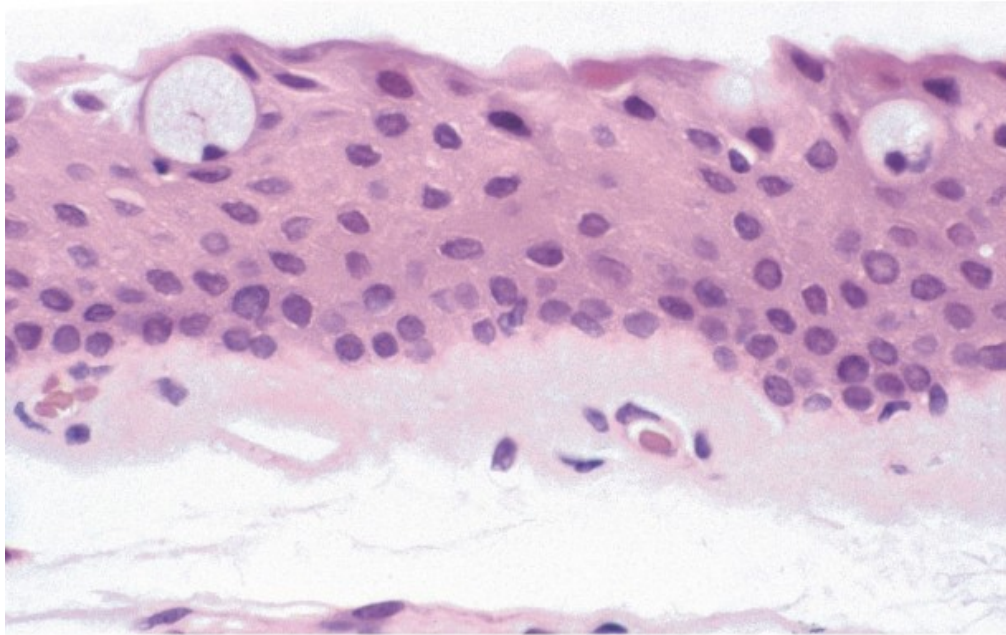


Abbildung 5: Nicht verhornendes Plattenepithel der Konjunktiva bulbi mit Becherzellen

Die konjunktivalen Epithelzellen lassen sich nach Art der vorherrschenden Organellen und der Zytoplasmastruktur in fünf Typen mit unterschiedlicher Funktion unterteilen: Die Sekretion von Muzinen und Proteinen obliegt den Becherzellen (Typ I) und Zellen mit sekretorischen Vesikeln (Typ II). Zellen, die reich an Golgi-Komplexen (Typ III) und rauem endoplasmatischem Retikulum (Typ IV) sind, unterstützen die sekretorischen Prozesse. Absorptive Vorgänge sind energieabhängig und werden daher von Zellen mit einem hohen Mitochondrienanteil (Typ V) getragen. Die Konjunktiva besitzt somit neben sekretorischen auch resorptive Eigenschaften, auf die auch das Vorhandensein zahlreicher fenestrierter subepithelialer Kapillaren hinweist [1].

Wie auch in anderen menschlichen Epithelverbänden stehen auch Bindehautzellen durch drei Arten von Zellkontakten miteinander in Verbindung: Tight junctions (Zonulae occludentes) verhindern durch Fusion benachbarter Zellmembranen den Durchtritt von Stoffen in den extrazellulären Spalt. Durch die Verankerung intrazellulärer Filamente in den Adherens junctions bzw. Desmosomen sichern diese eine feste interzelluläre

Verbindung. Schließlich erlauben Gap junctions (Nexus) durch ihre porenbildenden Connexin-Einheiten einen interzellulären Stoff- bzw. Signalaustausch [6].

Die oberflächlichen polygonalen Bindehautzellen tragen apikal zahlreiche Mikrovilli und Mikroplicae mit glykokalixähnlicher Struktur, die nicht nur die absorbierende und sezernierende Epitheloberfläche vergrößern, sondern auch zur Adhärenz des Tränenfilms beitragen [1].

1.2 Pollenproteasen und ihre Rolle im Rahmen der pflanzlichen Befruchtung

Pollenproteasen sind für den pflanzlichen Befruchtungsvorgang von essentieller Bedeutung. Am menschlichen Auge können sie jedoch zu erheblichen pathologischen Reaktionen führen. Die Kenntnis von Art, Funktion und Wirkmechanismus der Pollenproteasen im Rahmen der pflanzlichen Befruchtung ist somit Grundvoraussetzung für das Verständnis der Wirkung dieser Enzyme auf humane Epithelzellen.

Der Befruchtungsvorgang bei Bedecktsamern (Angiospermae) (Abbildung 6) nimmt seinen Ausgang von der Entstehung der Pollenkörner durch Meiose aus Pollenmutterzellen. Die reifen Pollenkörner werden aus den Staubbeuteln (Antheren) freigesetzt. Ein Pollenkorn beherbergt lediglich zwei Zellen, eine vegetative und eine generative Zelle. Trifft der Pollen im Rahmen der Bestäubung auf die Narbe des Stempels, beginnt aus der vegetativen Zelle ein Pollenschlauch auszukeimen, der in das weibliche Gewebe vordringt. Die Wachstumsrate des Pollenschlauchs kann dabei bis zu 3 mm pro Stunde betragen. Die generative Zelle teilt sich unterdessen in zwei Spermienzellen, die bei Erreichen des Fruchtknotens in den Embryosack entlassen werden, wo schließlich die Befruchtung stattfindet [7, 8].

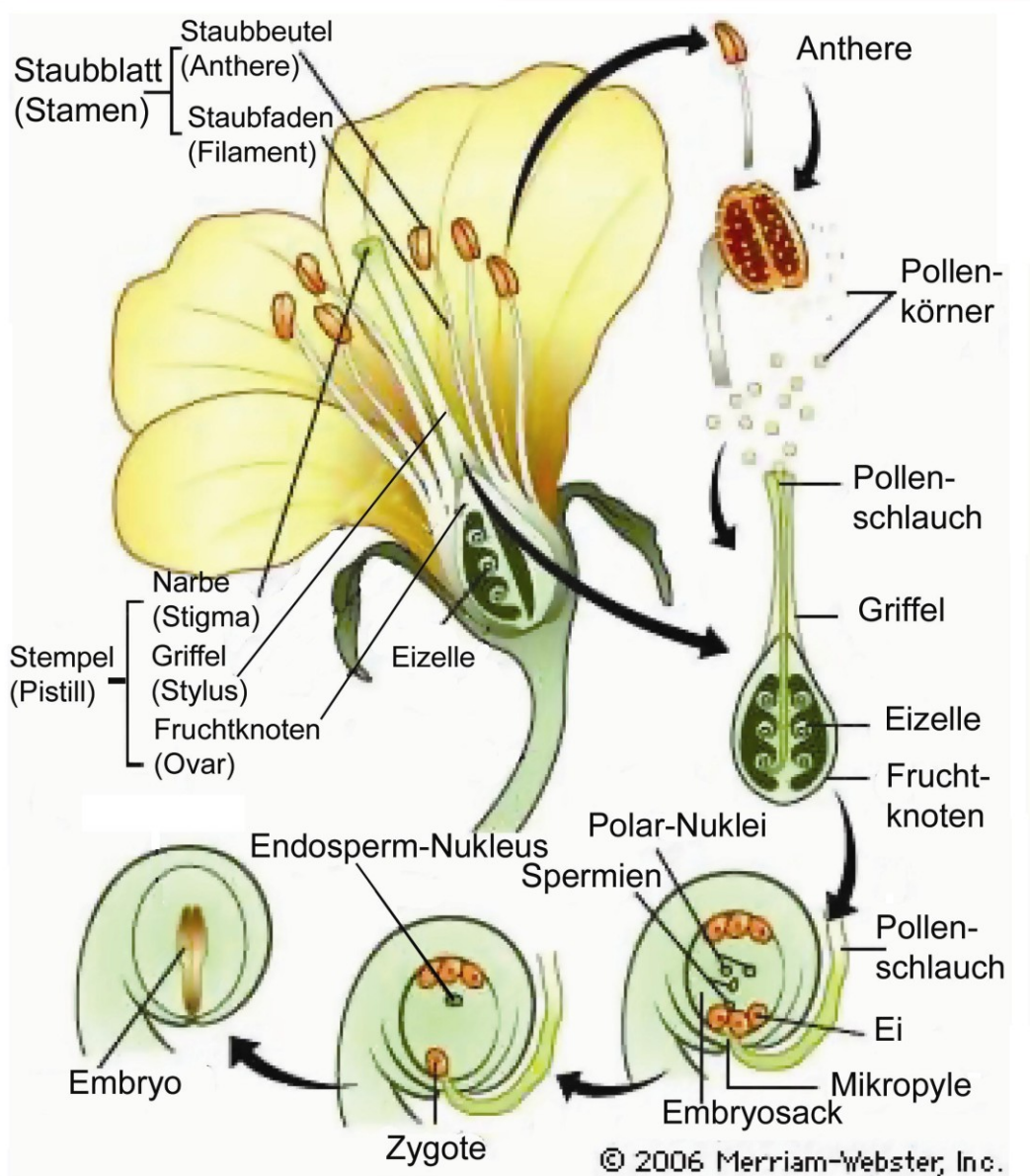


Abbildung 6: Befruchtung bei Bedecktsamern (Angiospermae)

All diese Prozesse, von der Adhäsion des Pollenkorns an der Narbe bis hin zur Befruchtung, sind an die Aktivität von Enzymen, vor allem von Proteasen, gebunden. Proteasen bzw. Peptidasen sind Enzyme, die imstande sind Polypeptide, Proteine und auch andere Enzyme hydrolytisch zu spalten. Sie kommen ubiquitär sowohl intra- als auch extrazellulär vor. Man unterscheidet Exoproteasen, die Peptidketten an den carboxy- bzw. aminoterminalen Enden angreifen (Carboxy- bzw. Aminopeptidasen), von Endoproteasen, die Proteine im Inneren spalten [8].

Im Pollenkorn sind die proteolytischen Enzyme in der Wand, im Inneren sowie im Pollenschlauch lokalisiert. Sie werden nach dem Vorhandensein charakteristischer Aminosäuren oder Metallionen im aktiven Zentrum in unterschiedliche katalytische Klassen eingeteilt. Zu den häufigsten zählen Serin-, Cystein-, Aspartyl- sowie Metalloproteasen. Auch solche mit Threonin oder Glutamat im katalytisch aktiven Zentrum wurden bereits identifiziert [7].

Zur Klassifizierung von in Pollenextrakten enthaltenen Proteasen verwendet man klassenspezifische Proteaseinhibitoren. Auf diese Weise konnten beispielsweise in Pollen der Weiß-Birke (*Betula papyrifera*) neben Serin- auch Cysteinproteasen nachgewiesen werden [9].

Pollen von Pflanzengattungen, die von Bienen bestäubt werden, wurden hinsichtlich des Vorkommens von vier Enzymaktivitäten analysiert. Es handelte sich dabei um Enzyme, die den tierischen Verdauungsenzymen Chymotrypsin, Trypsin und Carboxypeptidase A und B ähnlich sind. Alle untersuchten Pollen wiesen zumindest eine chymotrypsinoide Aktivität auf; andere Enzymaktivitäten kamen irregulär vor [10].

Um die Rolle der Pollenproteasen im Rahmen der pflanzlichen Befruchtung näher zu charakterisieren, sollen hier exemplarisch zwei experimentell identifizierten Proteasen aus Mais-Pollen (*Zea Mays*, Linie Co255) angeführt werden: Bei der einen handelt es sich um eine Serinprotease mit monomerer Struktur und einem Molekulargewicht von ca. 21 kDa. Das in inneren Pollenstrukturen lokalisierte Enzym bewirkt eine gesteigerte Polypeptidsynthese im auskeimenden Pollenschlauch. Der Angriffspunkt der Protease ist dabei ein Peptid, das die Aktivität von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen hemmt. Durch Einwirkung der Serinprotease entsteht ein Produkt, das die Aktivität der Schlüsselenzyme der Polypeptidsynthese steigert [7].

Die Wachstumsrate des Pollenschlauchs variiert je nach Spezies. Besonders rasches Wachstum weisen Gräser auf, wozu auch der Mais zählt. Eines seiner Pollenkörner misst 90 µm im Durchmesser und keimt in kürzester Zeit in einen Pollenschlauch mit mehreren Dutzend Zentimeter Länge aus. Ein solcher Vorgang kann nur durch eine prompte Intensivierung der Proteinsynthese ermöglicht werden, wobei wie dargestellt, Proteasen eine bedeutende Rolle spielen [7].

In Mais-Pollen derselben Linie wurde ein weiteres proteolytisches Enzym entdeckt. Diese dimere, etwa 60 kDa schwere Aspertylprotease ist in der äußeren Schicht der Pollenwand lokalisiert und daher leicht auswaschbar. Das Enzym hydrolysiert selektiv Proteine des Narbenexsudats. Es ist jedoch unklar, ob dieses Enzym die für die Auskeimung und das Wachstum des Pollenschlauchs nötigen Substrate bereitstellt, die Penetration des Pollenschlauchs durch das Gewebe der Narbe ermöglicht oder gar andere Funktionen erfüllt. Es scheint auf jeden Fall in den Keimungsprozess des Pollenkorns involviert zu sein [7].

Aus den Pollen von Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) konnten zwei Chymotrypsin- bzw. Trypsin-ähnliche Serinproteasen isoliert werden, die lediglich fähig sind kurze Peptide zu spalten. Man nimmt an, dass sie an der Pollenschlauchentwicklung und / oder an der Pollen-Stempel-Interaktion beteiligt sind, indem sie Precursor-Proteine spalten und Signalpeptide prozessieren [7].

Eine weitere interessante Protease wurde in Pollen von Lieschgras (*Phleum pratense*) gefunden. Das Enzym (nPhl p 1) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa. Die Aktivität des frisch isolierten Enzyms ist schwach und es bedarf einer Präinkubation in einem Cystein-hältigen Aktivierungspuffer unter reduzierenden Bedingungen. Seine volle Aktivität erlangt das der Cystein-Klasse zuzuordnende Enzym durch Abspaltung einer Prosequenz am N-terminalen Ende. Durch die Spaltung von Extensin, das für Aufbau und Wachstum der pflanzlichen Zellwand essentiell ist, verursacht diese Protease eine Auflockerung der Zellwand, wodurch das Einwachsen des Pollenschlauchs in das Stempelgewebe erleichtert wird [7].

In Anbetracht der bei zahlreichen nachgewiesenen Nicht-Allergikern am vorderen Augenabschnitt auftretenden Symptome erscheint es sinnvoll, die Ursachen dieser vermutlich durch Pollenproteasen vermittelten Beschwerden näher zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Pollen

2.1.1 Sammlung

Die Versuche werden mit in der Natur gesammelten Pollen der Birke (*Betula pendula*) durchgeführt. Die männlichen Blütenstände (Abbildung 7 und 8), die den Pollen enthalten, werden getrocknet, gesiebt und anschließend in Papiertüten bei Raumtemperatur gelagert.



Abbildung 7: Männliche Blütenstände der Birke

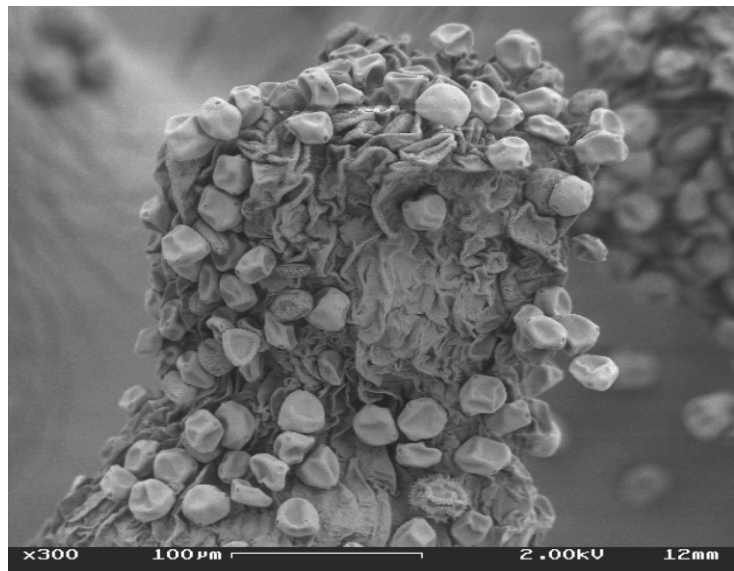


Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines männlichen Blütenstands der Birke mit Pollen

2.1.2 Pollenextrakte

2.1.2.1 Bereitung von Pollenextrakten für die Zymographie

Zum Nachweis der Enzymaktivität der für die Zellversuche verwendeten Pollen, wird eine Zymographie durchgeführt. Dazu werden 20 mg Birkenpollen und als Vergleichsprobe 10 mg Knäuelgraspollen mit je 100 µl physiologischer Kochsalzlösung in Eppendorf-Hütchen vermischt und ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Proben für 5 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert, sodass sich ein Überstand bildet. Die so

gewonnenen Pollenextrakte werden mittels Zymographie bezüglich ihrer Enzymaktivität getestet.

2.1.2.2 **Bereitung von Pollenextrakten für die Versuche mit CHANG-Zellen**

Für die Zellversuche werden Extrakte aus Birkenpollen in zwei verschiedenen Konzentrationen (5 mg bzw. 25 mg Pollen pro ml Medium) bereitet. Hierzu werden in der sterilen Werkbank (Sicherheitswerkbank K1.2 Herasafe, Kendro Heraeus, Berlin, Deutschland) 60 mg bzw. 300 mg Birkenpollen mit 12 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) und 1% P/S (Penicillin/Streptomycin, Biochrom, Berlin, Deutschland) versetzt. Die Pollensuspensionen werden für 24 Stunden bei 4°C inkubiert und danach für 5 Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert. Durch steriles Abfiltrieren der Überstände erhält man reine Pollenextrakte, welche für die Zellversuche herangezogen werden.

2.1.3 **Zymographie**

2.1.3.1 **Beschreibung**

Die Zymographie ist eine spezielle Art der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und dient zum Aktivitätsnachweis von Enzymen, hier speziell von Pollenproteasen. Das Polyacrylamidgel ist mit einem Substrat - in diesem Fall mit einem Protein – kopolymerisiert. Die in den Proben enthaltenen Proteine bzw. Proteasen werden elektrophoretisch nach Größe und Ladung aufgetrennt. Proteasen, die imstande sind sich nach Entfernung von SDS zu renaturieren und proteolytische Aktivität auszuüben, können mit dieser Methode nachgewiesen werden. Durch Färben des Gels werden jene Stellen, an denen die Gelproteine durch die Proteasen abgebaut wurden, als helle Banden sichtbar. Mittels Zymographie lässt sich lediglich untersuchen, ob die Pollen, die für die Zellversuche verwendet werden, proteolytische Aktivität beinhalten, nicht jedoch welcher katalytischen Klasse die Proteasen zuzuordnen sind.

2.1.3.2 **Durchführung**

Elektrophorese: Zur Herstellung der Pufferlösung werden 80 ml Tris-Glycine SDS Running Buffer (Invitrogen Novex®, Carlsbad, California, USA) mit 800 ml Aqua dest. vermischt. Mit dem Puffer werden die Slots der Acrylamidgelplatte [10% Zymogram (Gelatin) Gel: Invitrogen Novex®, Carlsbad, California, USA] gespült und aufgefüllt.

Anschließend wird die Platte in die Elektrophoresekammer (Invitrogen Novex®, Carlsbad, California, USA) gestellt (Abbildung 9).

15 µl des Überstandes der Probe bzw. der Kontrolle (siehe oben) werden mit Probenpuffer im Verhältnis 1:2 vermischt. Nach steriler Filtration des restlichen Überstandes werden nochmals 15 µl mit Probenpuffer 1:2 verdünnt. Von den so hergestellten Gemischen werden je 20 µl / Slot auf das Gel aufgetragen. Die Kammer wird mit Pufferlösung befüllt, zugedeckt und an Elektroden angeschlossen. Die Laufzeit beträgt 1 Stunde bei 125 Volt.

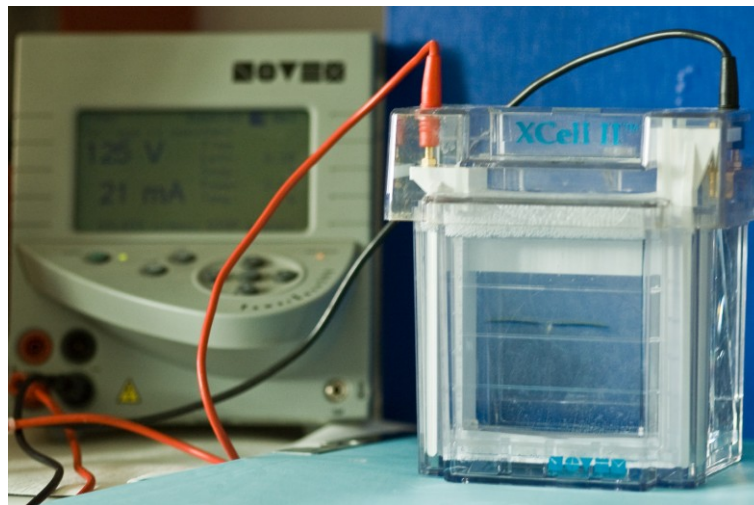


Abbildung 9: Elektrophoresekammer

Fixieren: Die Platte wird der Kammer entnommen und das Gel in ein Bad aus Fixierlösung gegeben. Die Fixierlösung besteht aus 12 ml Renaturing Buffer (Invitrogen Novex®, Carlsbad, California, USA) und 108 ml Aqua dest.. Das Gel wird im Fixierbad für 30 Minuten am Schüttler (Heidolph, Kelheim, Deutschland) inkubiert.

Entwickeln: Mit 24 ml Developing Buffer (Invitrogen Novex®, Carlsbad, California, USA) und 216 ml Aqua dest. wird die Entwicklerlösung hergestellt. Das Gel wird in der Hälfte der Lösung für 30 Minuten am Schüttler inkubiert. Nach Dekantierung wird das Gel im Rest der Lösung für ca. 24 Stunden bei 37°C am Schüttler inkubiert.

Färben: Zur Herstellung der Färbelösung werden 2,5 g Coomassie Blau (Serva, Heidelberg, Deutschland), 150 ml Isopropanol und 50 ml konzentrierte Essigsäure mit 500 ml Aqua dest. vermischt. Das Gel wird in der Färbelösung für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur am Schüttler inkubiert. Anschließend wird es in Aqua dest. entfärbt. Das Ergebnis wird fotografisch dokumentiert.

2.2 Bindehautzellkultur

2.2.1 CHANG-Zellen

Verwendet werden kultivierte, humane Bindehautzellen, sogenannte CHANG-Zellen (Co. ATCC, CCL-20.2, clone 1-5c-4m, Wong-Kilbourne derivatives of CHANG conjunctiva, Manassas, Virginia, USA). Diese Zelllinie ist aufgrund des Vorkommens von HeLa-Marker-Chromosomen immortalisiert. CHANG-Zellen produzieren zudem Keratin und zeigen ein adhärentes Wachstumsverhalten.

2.2.2 Kultivierung

Die Zellen werden in Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert. Vor Gebrauch werden sie aufgetaut und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Um das DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen werden sie 5 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert, in 1000 μl Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm^2 fassende Kulturflasche (Sarstedt, Wiener Neudorf, Austria) überführt. Anschließend werden 4 ml DMEM mit 1% P/S und 10% FBS (Fetal Bovine Serum, PAA, Pasching, Österreich) hinzugefügt und die Zellsuspension im CO_2 -Brutschrank (Heracell 240, Kendro Heraeus, Berlin, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Das Medium wird nach zwei bis drei Tagen gewechselt. Das Zellwachstum wird unter dem Phasenkontrastmikroskop (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Deutschland) beurteilt (Abbildung 10). Die Zellen sind versuchstauglich, wenn sie zu ca. 90% konfluent sind.



Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskop

2.2.3 Zellsuspension

Zur Bereitung einer Zellsuspension wird zunächst das Medium aus der Kulturflasche entfernt und der Zellrasen mit DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) gespült. Damit sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen, wird 1 ml Trypsin (Biochrom, Berlin, Deutschland) zugesetzt. Nach zweiminütiger Einwirkzeit im Brutschrank wird die Zellablösung unter dem Mikroskop begutachtet. Danach wird die Trypsinwirkung durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wird nun in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert, um sicherzustellen, dass das Trypsin vollständig entfernt wurde. Nach Entfernung des Mediums werden die Zellen mit 2 ml Medium resuspendiert. Um eine ausreichende Menge an Zellsuspension mit der gewünschten Zelldichte zu erhalten, wird eine Zellanalyse mit dem CASY1 Cell Counter durchgeführt.

2.2.4 Zellanalyse mittels dem CASY1 Cell Counter

2.2.4.1 Beschreibung

Der CASY1 Cell Counter (Modell TT, Schärfe-System, Reutlingen, Deutschland) (Abbildung 11) dient der Analyse von Zellkulturen. Beim Durchgang durch eine Messkapillare werden die Zellen mit einer Rate von 10^6 Messungen pro Sekunde abgetastet. Informationen über Zahl, Konzentration, Volumen, Durchmesser und Größenverteilung der Zellen können anschließend vom Display abgelesen werden. Aus der graphischen Darstellung der Zellgrößenverteilung können Rückschlüsse auf die Zellvitalität gezogen werden.



Abbildung 11: CASY1 Cell Counter

2.2.4.2 Durchführung

Vor der Aussaat der CHANG-Zellen muss zunächst die Zelldichte der Zellsuspension bestimmt werden. Dazu werden 100 µl Zellsuspension und 9,9 ml CASYton isotone Messlösung (Schärfe-System, Reutlingen, Deutschland) in ein CASY-Messgefäß pipettiert und dieses anschließend in den Counter eingeführt. Anhand der gemessenen Zelldichte werden Berechnungen durchgeführt, um eine ausreichende Menge an Zellsuspension mit einer empirischen Zelldichte von 30.000/ml zu erhalten.

Dieselbe Methode findet auch bei der Analyse der mit Pollenextrakt inkubierten Zellen Anwendung.

2.2.5 Aussaat

Die Zellen werden auf 96-Well-Platten (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) ausgesät (Abbildung 12). Hierzu werden pro Well 200 µl Zellsuspension mit einer Dichte von 30.000 Zellen/ml aufgetragen. Danach werden die Platten für 24 Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert.



Abbildung 12: Zellaussaat auf 96-Well-Platten mit einer Multikanalpipette (Eppendorf Research®, Hamburg, Deutschland)

2.3 Inkubation der CHANG-Zellen mit Birkenpollenextrakt

Die am Vortag besäten 96-Well-Platten werden dem Brutschrank entnommen und das Zellwachstum unter dem Phasenkontrastmikroskop begutachtet. Es werden zwei Platten mit Pollenextrakt von geringerer Konzentration (5 mg/ml) und 2 Platten mit dem höherkonzentrierten Pollenextrakt (25 mg/ml) behandelt.

Zunächst wird in der sterilen Werkbank das Medium entfernt und jedes Well zweimal mit 30 µl DMEM plus 1% P/S gespült. Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, werden die Platten folgendermaßen behandelt: Um Verdunstung zu vermeiden, werden die äußeren Wells mit Aqua dest. (A) befüllt. 100 µl DMEM plus 1% P/S werden in die mit B bezeichneten Wells pipettiert. In die als BP bezeichneten Wells werden 100 µl Pollenextrakt appliziert, ebenso wie in die Zellen enthaltenden Probenwells (P). Als Kontrolle (K) dienen jene Wells, die Zellen mit 100 µl DMEM plus 1% P/S enthalten. Anschließend werden die Platten für 5 bzw. 24 Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
B	A	B	B	B	B	B	BP	BP	BP	BP	BP	A
C	A	K	K	K	K	K	P	P	P	P	P	A
D	A	K	K	K	K	K	P	P	P	P	P	A
E	A	P	P	P	P	P	K	K	K	K	K	A
F	A	P	P	P	P	P	K	K	K	K	K	A
G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabelle 1: Pipettierschema einer 96-Well-Platte: A = Aqua dest., B = Blank, BP = Blank und Pollenextrakt, K = Kontrolle (Zellen), P = Probe (Zellen und Pollenextrakt)

2.4 Zellvitalitätsmessung mittels MTS-Test

2.4.1 Beschreibung

Der MTS-Test ist eine kolorimetrische Messmethode zur Quantifizierung der Zellvitalität. MTS ist ein gelbes Tetrazoliumsalz [3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Promega, Madison, Wisconsin, USA], das durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen zu einem blau-violetten Formazan-Produkt reduziert wird. Durch Verwendung eines ELISA-Mikroplatten-Lesegeräts (Anthos Reader 2010, Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) (Abbildung 13) wird die Extinktion des MTS-Reaktionsprodukts bei einer Wellenlänge von 545 nm bestimmt. Je höher die Extinktion, desto vitaler sind die Zellen.



Abbildung 13: ELISA-Mikroplatten-Lesegerät

2.4.2 Durchführung

Die 5 bzw. 24 Stunden zuvor mit Pollenextrakt behandelten Platten werden zunächst unter dem Mikroskop auf eventuelle zytomorphologische Veränderungen hin inspiziert. In der sterilen Werkbank wird anschließend das Medium entfernt und jedem Well 100 μ l DMEM plus 1% P/S und 10 μ l MTS-Reagenz hinzugesetzt. Die Platte wird danach für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach werden die Platten zur Testauswertung in den ELISA-Reader eingeführt.

2.5 Statistische Datenauswertung

Die abschließende statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt unter Verwendung der Statistik- und Analyse-Software SPSS 14® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Um die Varianzgleichheit zu prüfen, wird der Levene-Test durchgeführt. Die Signifikanzprüfung erfolgt durch Anwendung des zweiseitigen T-Tests für unabhängige Stichproben, wobei ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ und ein Konfidenzintervall von 95% festgelegt wird.

3 Resultate

3.1 Mikroskopische Analyse der CHANG-Zellen nach Inkubation mit Birkenpollenextrakt

Die Untersuchung der CHANG-Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop zeigt, dass Zellen, die mit Pollenextrakt behandelt wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen schwere strukturelle Veränderungen aufweisen (Abbildungen 14, 15 und 16). Der Großteil der unter normalen Bedingungen adhärent wachsenden Zellen hat sich gelöst und treibt frei in der Flüssigkeit. Lediglich ein kleiner Teil der Zellen hat überlebt und zeigt ein normales Wachstumsmuster.

Nach fünfstündiger Inkubation mit dem höherkonzentrierten Pollenextrakt (25 mg/ml) (Abbildung 15) zeigt sich keine signifikante Abnahme der Zellzahl, jedoch ist eine Veränderung der Zellparameter zu beobachten. Der Durchmesser und das Volumen der Zellen haben sich scheinbar vergrößert, was sich durch Analyse mittels dem CASY1 Cell Counter bestätigt (siehe unten). Die Zellen haben Kugelform angenommen, was auf eine beginnende Zellnekrose hindeutet.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 25 mg/ml Pollenextrakt (Abbildung 16) zeigen sich zahlreiche Zellfragmente und es finden sich kaum noch lebende Zellen. Anzahl, Durchmesser und Volumen der Zellen haben sich scheinbar drastisch minimiert, wie auch die CASY-Analyse bestätigt (siehe unten). Die Zellen befinden sich offensichtlich in einem fortgeschrittenen Nekrotestadium.

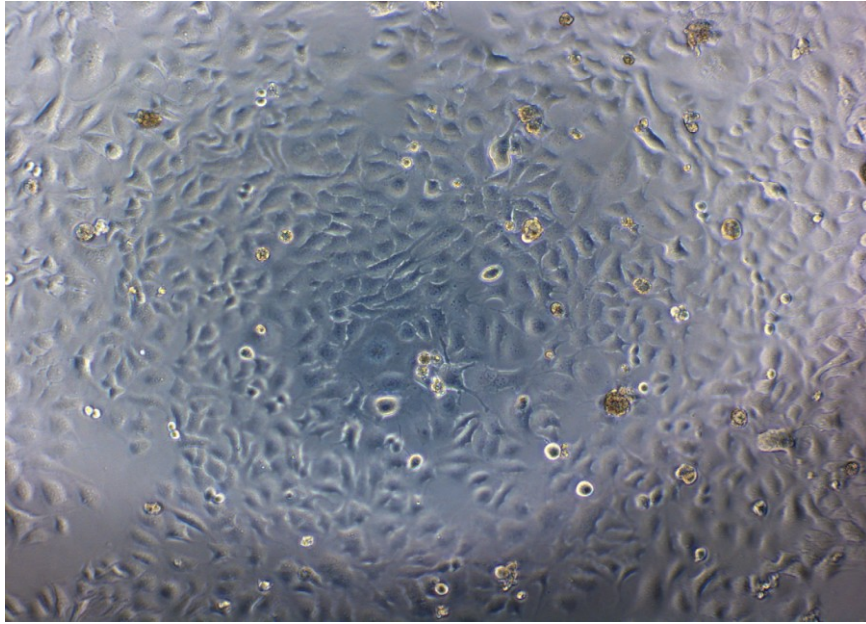


Abbildung 14: Kontrolle, CHANG-Zellen ohne Behandlung mit Pollenextrakt

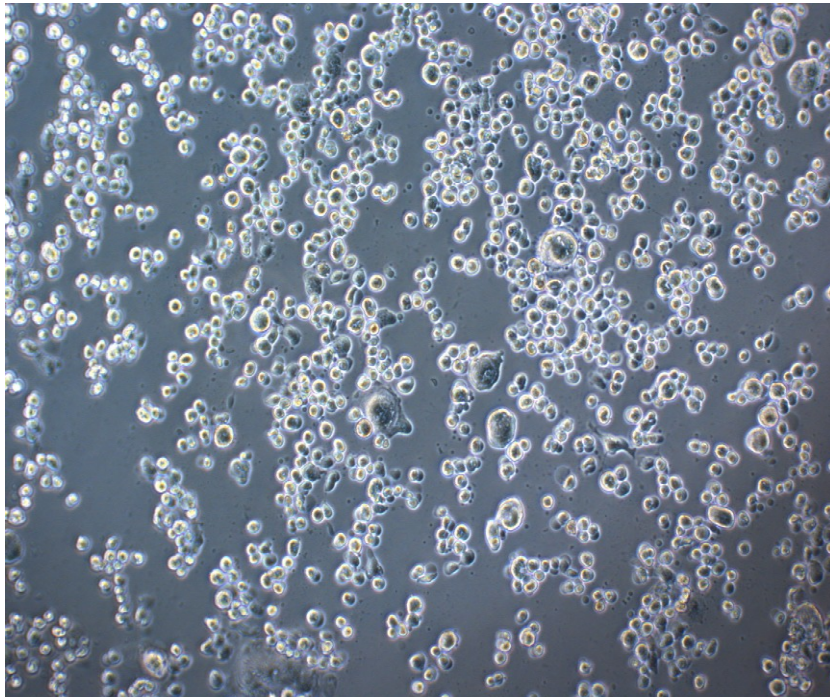


Abbildung 15: CHANG-Zellen nach 5 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt

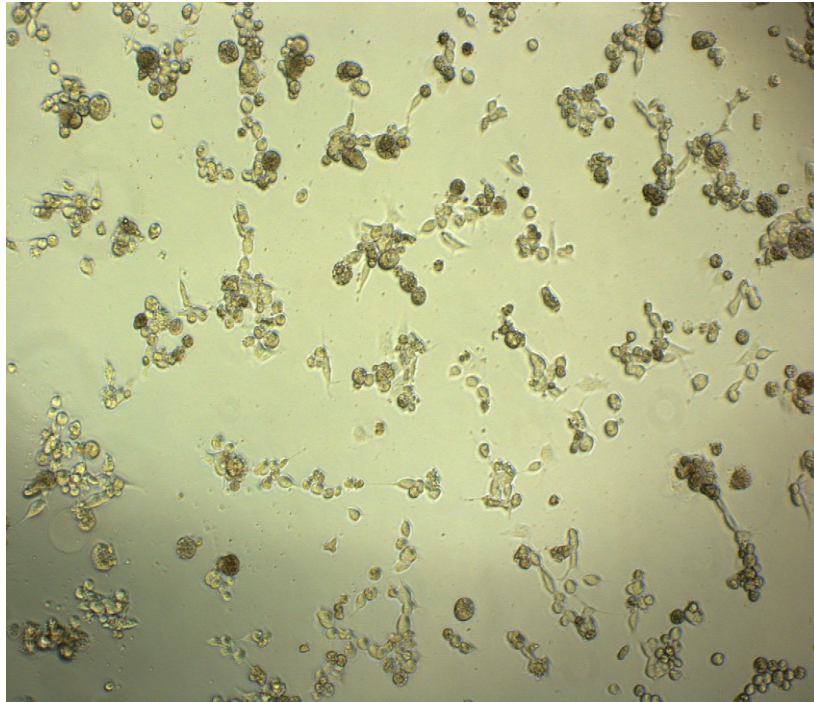


Abbildung 16: CHANG-Zellen nach 24 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt

3.2 Zymographie

Um die Aktivität von Proteasen in Birkenpollen nachzuweisen, wurde eine Zymographie durchgeführt. Das Zymogramm bestätigt, dass die Pollen enzymatisch aktive Proteasen beinhalten (Abbildung 17). Die Bahnen 1 bis 6 zeigen das Zymographiespektrum von Birkenpollen, die Bahnen 8 und 9 jenes von Knäuelgraspollen. In Anbetracht der unterschiedlichen Spektren der beiden Pollenarten lässt sich schließen, dass verschiedene Pollenarten unterschiedliche Proteasenklassen mit unterschiedlicher enzymatischer Aktivität beinhalten.

Mittels Zymographie gelingt lediglich der Nachweis von Proteaseaktivität. Sie gibt jedoch weder Aufschluss darüber, ob es sich um Endo- oder Exoproteasen handelt, noch welchen katalytischen Klassen die Proteasen angehören.

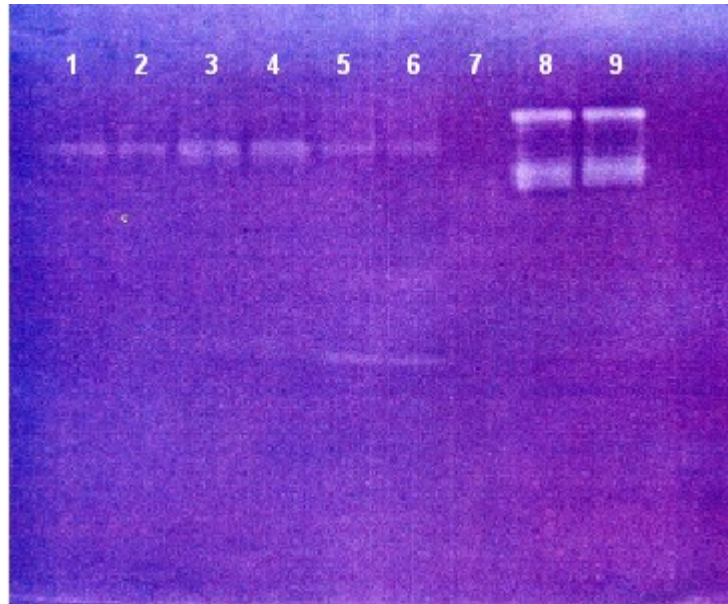


Abbildung 17: Zymogramm, Bahnen 1 – 6 Birkenpollen, Bahn 7 leer, Bahnen 8 und 9 Knäuelgraspollen

3.3 CASY1 - Zellanalyse

Die Analyse der mit Pollenextrakt inkubierten CHANG-Zellen mittels dem CAYS1 Cell Counter System zeigt, dass sich im Vergleich zu den Kontrollzellen die Zellzahl nach einer Inkubationszeit von 5 bis 24 Stunden drastisch minimiert hat (Abbildung 18).

Dagegen steigt der mittlere Durchmesser der Zellen in den ersten Stunden der Inkubation an; erst nach 5 Stunden beginnt er zu fallen (Abbildung 19). Die initiale Vergrößerung des Zelldurchmessers korreliert mit der mikroskopisch festgestellten Kugelform der Zellen und ist ein Zeichen beginnender Nekrose. Die spätere Zellverkleinerung, wie auch unter dem Mikroskop zu beobachten, ist ein Ausdruck fortgeschrittener Nekrose.

Die zeitabhängige Veränderung des mittleren Zelldurchmessers korreliert mit dem Verlauf des mittleren Zellvolumens (Abbildung 20). Auch hier zeigt sich anfangs eine Zunahme des Zellvolumens, das nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden auf 91 Prozent des ursprünglichen Wertes absinkt.

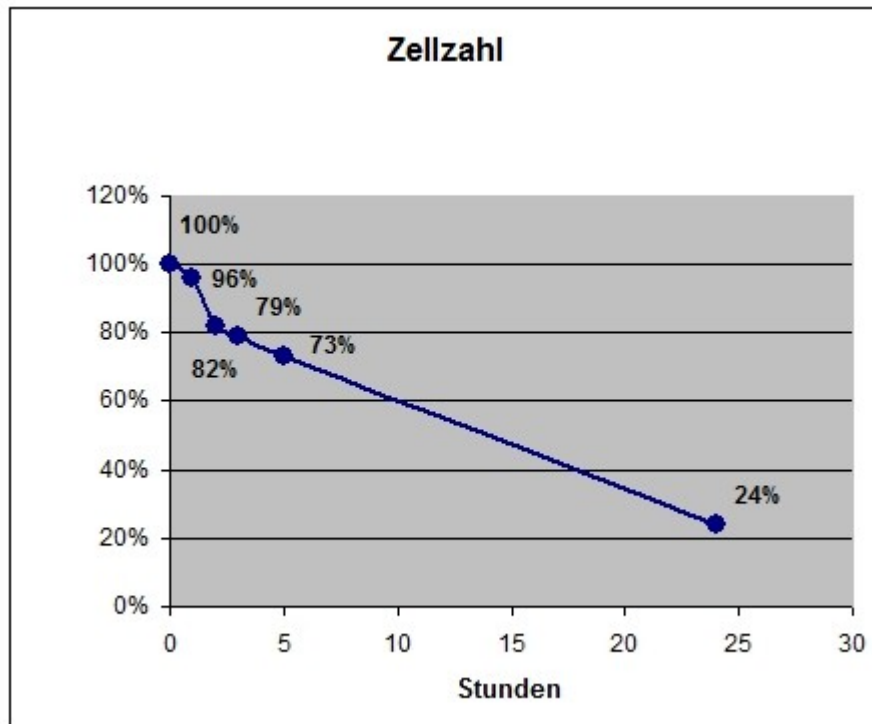


Abbildung 18: Abnahme der Zellzahl nach Inkubation der CHANG-Zellen mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt

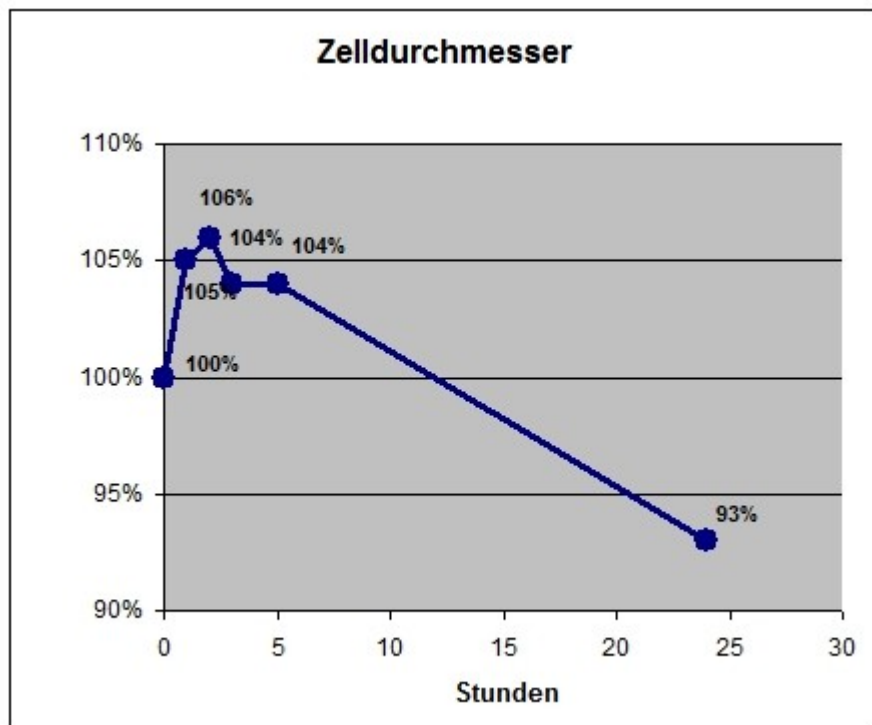


Abbildung 19: Veränderung des mittleren Zelldurchmessers nach Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt

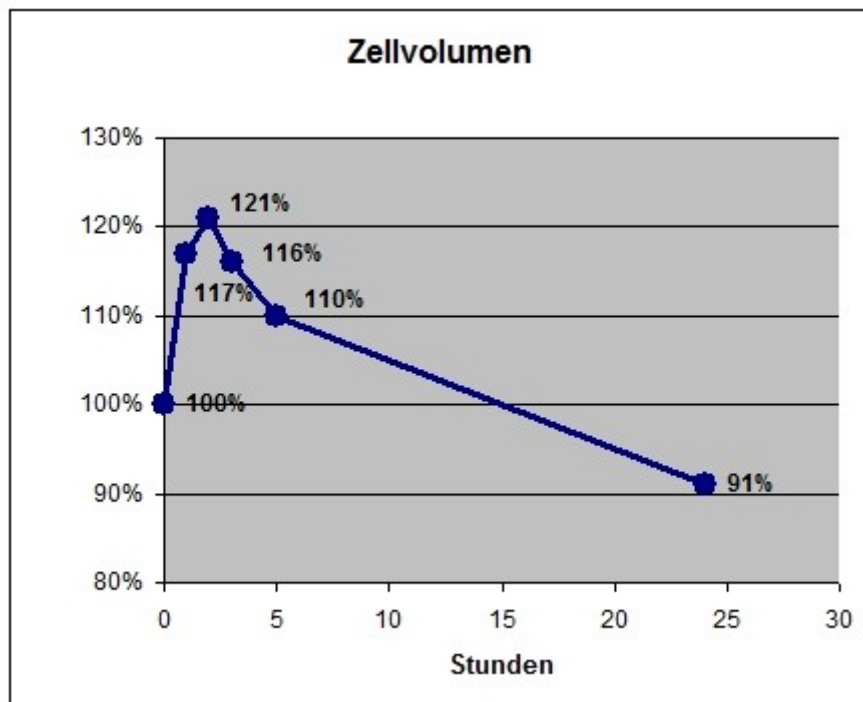


Abbildung 20: Veränderung des mittleren Zellvolumens nach Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt

Diese Veränderungen der Zellparameter können durch den CASY1 Cell Counter auch graphisch dargestellt werden (Abbildungen 21 - 23). Auf der Abszisse ist die Zellgröße in Femtometer aufgetragen, auf der Ordinate ist die Zellzahl verzeichnet. Der Messbereich ist variabel und kann geändert werden. Durch Setzen des Cursors auf die gewünschte Position erfolgt die Berechnung automatisch. Wie anhand der folgenden Diagramme ersichtlich, führt die Inkubation der CHANG-Zellen mit Pollenextrakt zu einer Linksverschiebung. Dies ist gleichbedeutend mit einer Abnahme von Anzahl, Durchmesser und Volumen der Zellen.

CASY1 MODEL TT CAP:150 um	COMMENT.....
RANGE: 12.00 TO 39.60 fm	DILUTION : 100
COUNTS/ml :1.489E06	SAMPLE : 2x400 ul
COUNTS >40 fm : 69	VOLUME (TOTAL):4.603E07 fl
DIAMETER (MAX) :16.40 fm	VOLUME (MAX) :2.310E03 fl
DIAMETER (MEAN) :18.46 fm	VOLUME (MEAN) :3.862E03 fl

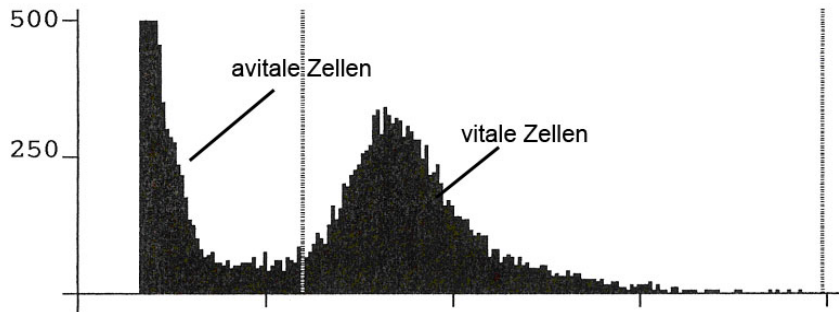


Abbildung 21: CASY1-Analyse: Kontrolle

CASY1 MODEL TT CAP:150 um	COMMENT.....
RANGE: 12.00 TO 39.60 fm	DILUTION : 100
COUNTS/ml :1.019E06	SAMPLE : 2x400 ul
COUNTS >40 fm : 79	VOLUME (TOTAL):3.594E07 fl
DIAMETER (MAX) :18.20 fm	VOLUME (MAX) :3.157E03 fl
DIAMETER (MEAN) :19.26 fm	VOLUME (MEAN) :4.409E03 fl

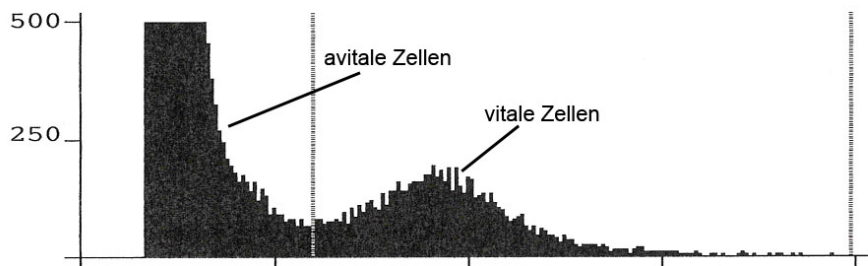


Abbildung 22: CASY1-Analyse: CHANG-Zellen nach 5 Stunden Inkubation

CASY1 MODEL TT CAP:150 um	COMMENT.....
RANGE: 12.00 TO 39.60 fm	DILUTION : 100
COUNTS/ml :3.285E05	SAMPLE : 2x400 ul
COUNTS >40 fm : 72	VOLUME (TOTAL):9.728E06 fl
DIAMETER (MAX) :12.60 fm	VOLUME (MAX) :1.047E03 fl
DIAMETER (MEAN) :17.49 fm	VOLUME (MEAN) :3.701E03 fl

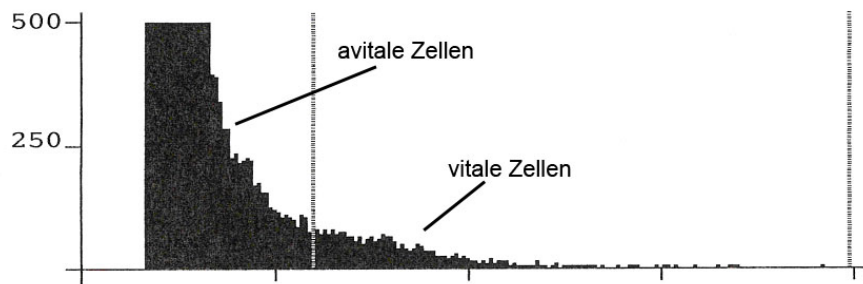


Abbildung 23: CASY1-Analyse: CHANG-Zellen nach 24 Stunden Inkubation

3.4 MTS-Testresultate

Um zu quantifizieren, welchen Einfluss die Inkubation der CHANG-Zellen mit Pollenextrakt auf die Zellvitalität hat, wurde der MTS-Test durchgeführt. Die Zellvitalität korreliert mit der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, die imstande sind MTS zu einem farbigen Reaktionsprodukt umzusetzen, dessen Extinktion mit dem ELISA-Reader bestimmt wird.

Da auch Pollen Dehydrogenasen enthalten [11], die zu einer Verfälschung der MTS-Testergebnisse führen, wurde – wie oben beschrieben – auf jeder 96-Well-Platte eine Reihe mit Pollenextrakt ohne Zellen angelegt (BP-Wells). Um reelle Resultate zu erzielen, werden die Extinktionsmittelwerte von jenen der Proben subtrahiert.

Indem auch das vor dem MTS-Test zugesetzte Medium einen gewissen Anteil der Extinktion ausmacht, wurde auch hierzu eine Leerwertreihe (B-Wells) angelegt. Die mittleren Extinktionswerte werden dann von jenen der Kontrollen abgezogen.

Anhand der niedrigeren Extinktionswerte im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich eine Abnahme der mitochondrialen Enzymaktivität in den mit Pollenextrakt behandelten Zellen, was einer Verringerung der Zellvitalität gleichzusetzen ist.

Die Unterschiede bezüglich den Extinktionswerten zwischen Kontrollen und Proben sind selbst mit freiem Auge ersichtlich (Abbildungen 24 und 25). Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 25 mg/ml Pollenextrakt sind die Probenwells kaum noch von den Blankwells zu unterscheiden, was darauf hinweist, dass kaum noch Zellen überlebt haben.

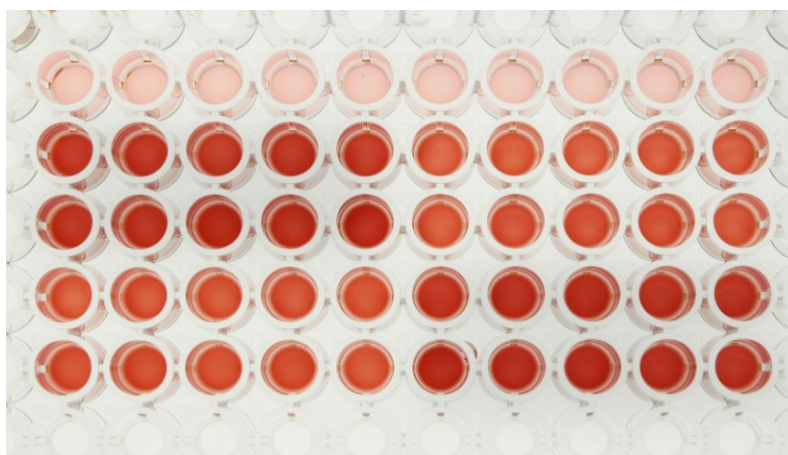


Abbildung 24: MTS-Test nach 5 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Pollenextrakt

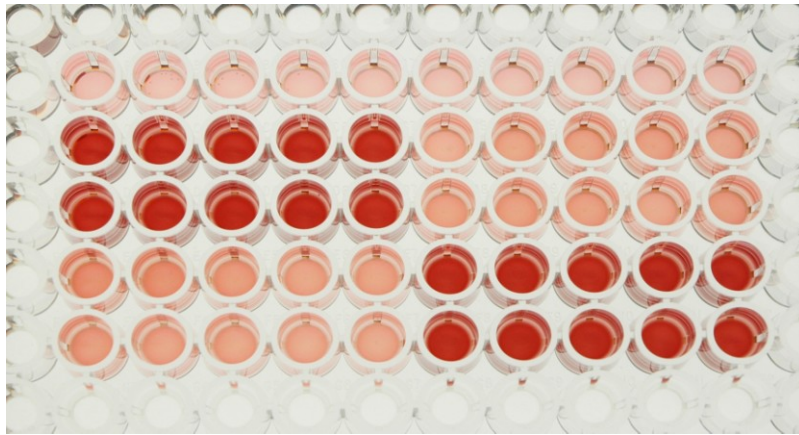


Abbildung 25: MTS-Test nach 24 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Pollenextrakt

Die Tabellen 2 bis 5 zeigen die exakten Extinktionswerte der Proben (rosa) und der Kontrollen (rot) sowie der B-Wells (hellgelb) und der BP-Wells (dunkelgelb) bei verschiedenen Pollenextraktkonzentrationen und Inkubationszeiten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
B	A	0,129	0,127	0,127	0,126	0,131	0,131	0,130	0,130	0,133	0,135	A
C	A	0,959	1,000	1,012	1,008	1,011	0,936	0,915	0,911	0,913	0,884	A
D	A	0,974	0,973	1,013	0,997	0,998	0,892	0,898	0,910	0,906	0,862	A
E	A	0,877	0,907	0,899	0,904	0,878	1,038	0,993	0,993	1,034	0,971	A
F	A	0,866	0,922	0,893	0,900	0,885	1,009	1,006	0,981	0,986	0,942	A
G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabelle 2: Extinktionswerte nach 5 Stunden Inkubation mit 5 mg/ml Birkenpollenextrakt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
B	A	0,147	0,144	0,142	0,147	0,145	0,146	0,145	0,146	0,146	0,149	A
C	A	0,942	0,950	0,916	0,965	0,927	0,730	0,738	0,719	0,743	0,721	A
D	A	0,958	0,967	1,046	0,992	1,066	0,769	0,785	0,790	0,788	0,749	A
E	A	0,727	0,778	0,769	0,778	0,781	0,957	0,996	1,031	0,968	0,956	A
F	A	0,780	0,821	0,786	0,831	0,778	1,097	1,018	1,023	1,000	0,947	A
G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabelle 3: Extinktionswerte nach 24 Stunden Inkubation mit 5 mg/ml Birkenpollenextrakt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
B	A	0,140	0,140	0,141	0,138	0,141	0,143	0,141	0,141	0,138	0,146	A
C	A	1,064	1,053	1,029	1,020	1,021	0,908	0,875	0,899	0,889	0,903	A
D	A	0,955	0,993	0,999	1,002	0,997	0,849	0,793	0,839	0,810	0,794	A
E	A	0,870	0,852	0,848	0,881	0,824	1,023	1,024	1,059	1,037	0,997	A
F	A	0,865	0,820	0,821	0,827	0,830	1,077	1,040	0,999	0,994	1,027	A
G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabelle 4: Extinktionswerte nach 5 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
B	A	0,153	0,151	0,153	0,152	0,155	0,155	0,156	0,155	0,162	0,166	A
C	A	1,000	0,994	0,996	0,985	0,979	0,278	0,343	0,355	0,361	0,324	A
D	A	0,980	0,988	1,020	0,997	0,976	0,348	0,358	0,345	0,297	0,361	A
E	A	0,435	0,430	0,378	0,333	0,340	1,010	1,009	0,994	1,028	1,024	A
F	A	0,356	0,321	0,314	0,293	0,301	0,991	0,991	0,974	0,983	0,967	A
G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
H	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Tabelle 5: Extinktionswerte nach 24 Stunden Inkubation mit 25 mg/ml Birkenpollenextrakt

Aus den Extinktionswerten der Proben und der Kontrollen sowie aus jenen der B- und BP-Wells wird jeweils der Mittelwert berechnet. Der Extinktionsmittelwert der Proben (abzüglich des BP-Mittelwerts) wird in Prozent bezogen auf den Kontrollmittelwert (abzüglich des B-Mittelwerts) ausgedrückt.

Daraus ergibt sich bei Inkubation der Zellen mit 5 mg/ml Pollenextrakt nach 5 Stunden eine verbleibende Vitalität von 88 Prozent und nach 24 Stunden lediglich noch 74 Prozent (Abbildung 26). Das bedeutet eine Abnahme der Zellvitalität um 12 Prozent nach 5 Stunden und um 26 Prozent nach 24 Stunden.

Bei Inkubation der Zellen mit 25 mg/ml Pollenextrakt beträgt die Zellvitalität nach 5 Stunden 80 Prozent und nach 24 Stunden nur noch 22 Prozent (Abbildung 27). Dies ist gleichbedeutend mit einer Verringerung der Zellvitalität um 20 Prozent nach 5 Stunden und um 78 Prozent nach 24 Stunden.

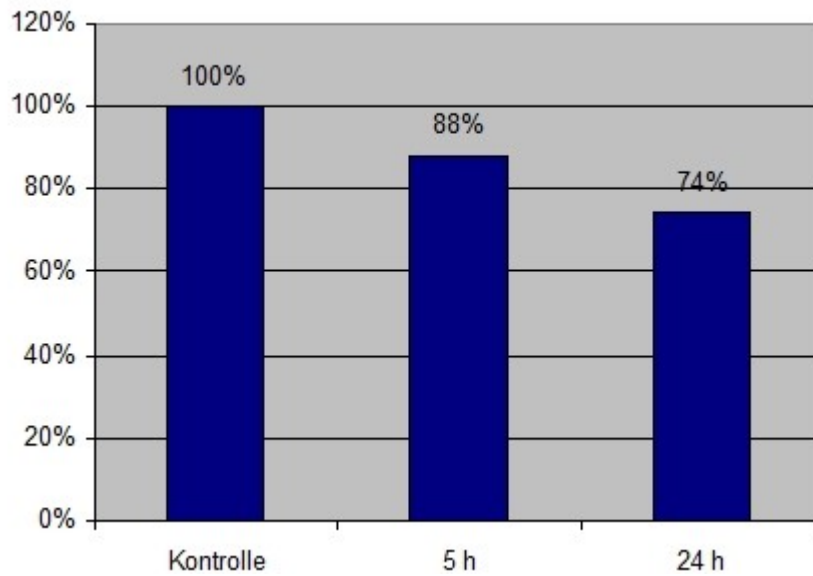


Abbildung 26: Zellvitalität nach Inkubation mit 5 mg/ml Pollenextrakt

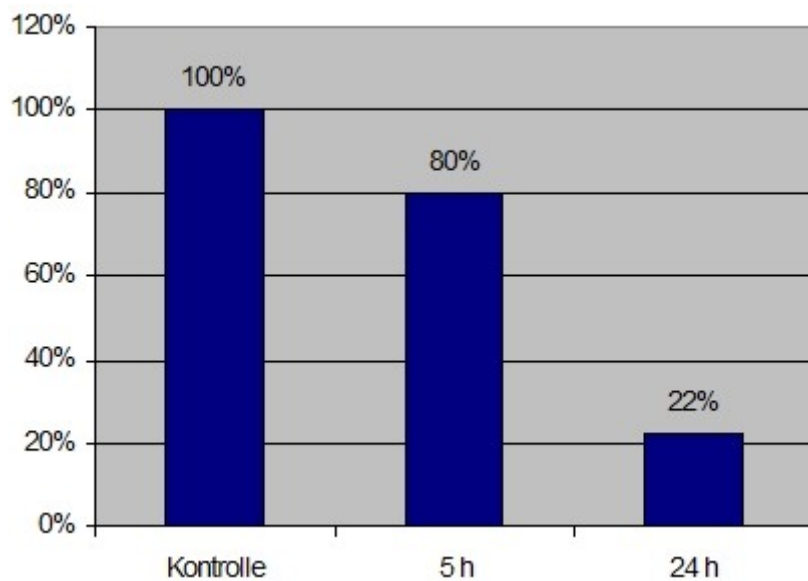


Abbildung 27: Zellvitalität nach Inkubation mit 25 mg/ml Pollenextrakt

Diese Werte veranschaulichen, dass die Zellvitalität sowohl mit fortschreitender Inkubationszeit als auch mit steigender Konzentration des Pollenextrakts abnimmt.

3.5 Statistische Datenauswertung

Das Ergebnis des Levene-Tests zeigt, dass die Varianzen der Proben gleich sind. Die T-Testresultate belegen, dass die Inkubation der CHANG-Zellen mit Birkenpollenextrakt zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Zellvitalität führt ($p = 0,000$; KI 95%). Die mittlere Differenz zwischen Kontrollen und Proben beträgt 33,76 %.

Gruppenstatistiken

	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes
ZellvitalitätProzent	ohne Pollenzusatz	80	100,0000	,00000	,00000
	mit Pollenzusatz	80	66,2432	26,52581	2,96568

Test bei unabhängigen Stichproben

		Levene-Test der Varianzgleichheit		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Signifikanz	T	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standardfehler der Differenz	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
ZellvitalitätProzent	Varianzen sind gleich	191,130	,000	11,383	158	,000	33,75683	2,96568	27,89935	39,61431
	Varianzen sind nicht gleich			11,383	79,000	,000	33,75683	2,96568	27,85380	39,65986

Abbildung 28: Ergebnisse der statistischen Datenauswertung mit SPSS

4 Diskussion

4.1 Einfluss von Pollenproteasen auf die Augenoberfläche

Untersuchungen der Wirkung von Pollenproteasen am Auge zeigen, dass sowohl der Tränenfilm als auch das okuläre Oberflächenepithel durch Pollenexposition beeinträchtigt wird.

4.1.1 Einfluss von Pollenproteasen auf den Tränenfilm

Kommen Pollenkörner mit Tränenflüssigkeit oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt, blähen sie sich auf und entlassen ihren Inhalt, u.a. auch Proteasen, durch Poren in der Pollenwand in die Umgebung [12] (Abbildungen 29 – 31). Dasselbe Phänomen konnte bei Zugabe von Kulturmedium zu Pollen beobachtet werden. Auch hierbei zeigten sich Strukturänderungen der Pollen wie bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten.

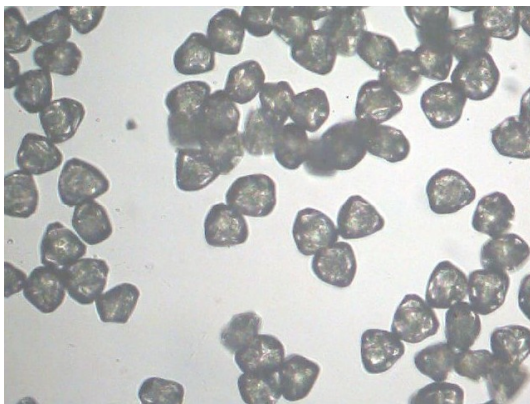


Abbildung 29: Pollen in trockenem Zustand

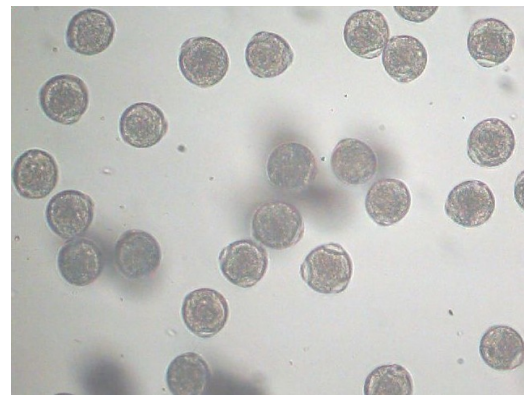


Abbildung 30: Pollen nach Flüssigkeitszugabe

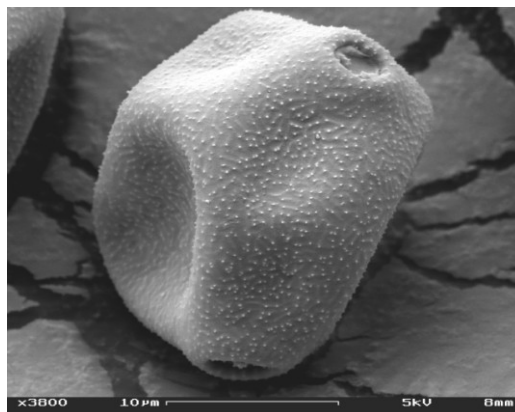


Abbildung 31: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Pollens mit Poren

Mittels biochemischer Methoden ließ sich unlängst nachweisen, dass die in der Tränenflüssigkeit enthaltenen Proteine innerhalb von Sekunden zerstört werden. Lysozym und Laktoferrin, Proteine mit immunologischer Abwehrfunktion, sind dabei besonders vom proteolytischen Abbau betroffen. Infolge der Proteinzerstörung verliert der Tränenfilm seine Stabilität und es kommt zum Auftreten von trockenen Stellen an der Augenoberfläche und zu unangenehmen Reizerscheinungen. Ähnliches kann bei Kontakt von Pollen mit Nasensekret beobachtet werden (Abbildung 32) [12].

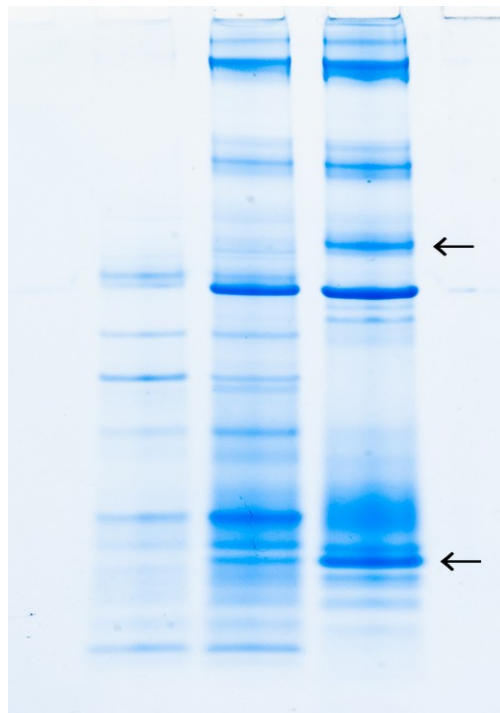


Abbildung 32: PAGE von Nasensekret (re.), Haselpollenextrakt (li.) und einer Mischung beider (Mitte). Die Pfeile deuten auf jene Proteine, die durch Pollenproteasen zerstört wurden.

4.1.2 Einfluss von Pollenproteasen auf das okuläre Oberflächenepithel

Die Epithelzellen von Horn- und Bindehaut sind ebenso der Proteasenwirkung ausgesetzt. Wie die Versuche mit CHANG-Zellen zeigen, führt die Behandlung mit Pollenextrakten zu zytomorphologischen Veränderungen sowie zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität. Die Untersuchungsergebnisse lassen somit den Rückschluss zu, dass die Exposition gegenüber Pollen auch in vivo zu einer konjunktivalen Schädigung führt.

Hiermit wird deutlich, dass sowohl eine Beeinträchtigung des Tränenfilms als auch eine direkte Schädigung von Bindehautzellen zu Reizerscheinungen und Entzündungen an Horn- und Bindehaut führen können (Abbildung 33).



Abbildung 33: Gereiztes Auge nach Pollenexposition

Berichten von Mitarbeiterinnen (BA) des Labors der Universitätsklinik für Augenheilkunde der Medizinischen Universität Graz zufolge, litten sie auch Stunden nach dem Kontakt mit Pollen, die sich bei der Aufbereitung des Pollenmaterials im Raum verteilten, an ökularen und nasalen Reizzuständen. Diese äußerten sich bei den nachweislich nichtallergischen Personen durch tränende, gerötete und juckende Augen sowie durch eine verstopfte oder rinnende Nase.

Diese Beobachtungen zeigen, dass den Pollenproteasen genügend Zeit zur Verfügung steht, um die Augenoberfläche zu schädigen, bevor sie mit dem Tränenfluss abtransportiert werden.

Genauere Angaben über die Verweildauer von Pollen auf der Augenbindehaut bzw. Nasenschleimhaut in vivo sind jedoch bisher noch ausständig.

4.1.3 Antiproteasen – Physiologische Schutzfaktoren

Zum Schutz vor proteolytischem Abbau sind in humanen Zellen und Körperflüssigkeiten Proteaseinhibitoren, auch Antiproteasen genannt, vorhanden. In Tränenflüssigkeit und Nasensekret finden sich u.a. α 1-Antitrypsin, α 1-Antichymotrypsin und α 2-Makroglobulin [12].

Mengenmäßig steht hier das α 1-Antitrypsin – ein unspezifischer Proteaseinhibitor – im Vordergrund. Es ist ein hauptsächlich von Hepatozyten synthetisiertes Akute-Phase-Protein, das in allen Körpergeweben und im Plasma vorkommt. Seine Wirkung basiert auf der Hemmung von Trypsin und anderen Serinproteasen [13, 14]. α 1-Antitrypsin ist somit in der Lage bestimmte Pollenproteasen zu inhibieren, vorausgesetzt es ist in ausreichender Menge vorhanden.

Sind nämlich die Antiproteasen in der Tränenflüssigkeit vermindert oder defekt, wie z.B. beim Syndrom des Trockenen Auges, können Pollenproteasen uneingeschränkt ihre destruktive Wirkung an der Augenoberfläche entfalten. Dies erklärt, weshalb nicht jeder Mensch gleichermaßen von der Proteasen-Reaktion betroffen ist. Auch die Kumulation ätiopathogenetischer Umweltfaktoren des trockenen Auges (z.B. Exposition gegenüber Wind, UV-Strahlung und Ozon) kann die Empfindlichkeit des Auges gegenüber Pollenproteasen steigern [2].

4.2 Pollenproteasen zerstören Tight junctions

Die mikroskopische Begutachtung der mit Pollenextrakt inkubierten CHANG-Zellen zeigte, dass sich die unter normalen Bedingungen adhärent wachsenden Zellen voneinander sowie von der Unterlage gelöst haben. Dieser Verlust des Zellzusammenhalts beruht scheinbar auf einem proteolytischen Abbau interzellulärer Kontaktproteine. Die beiden folgenden Studien haben diesen Effekt genauer untersucht.

Eine portugiesische Forschergruppe stellte Studien zur Untersuchung der Wirkung von Pollenproteasen auf humane Alveolarepithelzellen an. Bei Experimenten mit Pollen von *Parietaria judaica* (ein Glaskraut aus der Familie der Brennnesselgewächse mit vorwiegender Verbreitung im Mittelmeerraum) konnten Serin-Endopeptidasen identifiziert

werden. Die Untersuchung der Wirkung dieser Proteasen auf humane Alveolarepithelzellen zeigte, dass sowohl Pollenextrakt als auch isolierte Serinproteasen zu einem Verlust des Zellzusammenhalts führen. Dieser ist auf die Spaltung von Zonula occludens 1 (ZO-1), ein zytoplasmatisches Protein der Tight junctions, zurückzuführen. Die Analyse des Effekts dieser Pollenenzyme auf Proteine der Adherens junctions (E-Cadherin und b-Catenin) ergab jedoch keinen Hinweis auf eine proteolytische Spaltung. Die Zugabe der Proteaseinhibitoren α 1-Antitrypsin und Aprotinin hatte keinen hemmenden Effekt auf die Enzymaktivität. Lediglich mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) zeigte sich eine leicht abgeschwächte proteolytische Aktivität. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Pollenproteasen in der Lage sind auch Proteaseinhibitoren wie α 1-Antitrypsin zu spalten, wodurch ein weiterer Schutzmechanismus außer Kraft gesetzt wird [15].

Eine weitere Studie beschäftigte sich ebenfalls mit der Erforschung des Effekts von Pollenproteasen auf interzelluläre Verbindungsmoleküle. Diffusate von allergenen Pollen von Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*), Weiß-Birke (*Betula papyrifera*), Wiesen-Rispengras (*Poa pratensis*) und Oster-Lilie (*Lilium longiflorum*) wurden Madin-Darby canine kidney- (MDCK-) Zellen und Calu-3-Zellen (humane Atemwegsepithelzellen) zugesetzt. Durch indirekte Immunfluoreszenz für Occludin, Claudin-1 und ZO-1 konnte nachgewiesen werden, dass Pollenproteasen aller vier Diffusate imstande sind epitheliale Tight junctions zu zerstören. Dieser Effekt zeigte sich nur an Proteinen der Tight junctions, nicht jedoch an Desmocollin von Desmosomen und E-Cadherin von Zonulae adherentes. Zudem wurde beobachtet, dass Tight junctions imstande sind sich teilweise wieder zu regenerieren. Die mittels Zymographie verifizierte proteolytische Aktivität der Pollendiffusate konnte durch Inhibitoren von Serin- und Cysteinproteasen gehemmt werden. Der Vergleich der Versuchsergebnisse beider Zelllinien zeigte, dass Tight junctions humaner Atemwegsepithelzellen empfindlicher gegenüber proteolytischer Zerstörung sind als jene anderer Zelltypen [16].

Die Zerstörung der Tight junctions ermöglicht das Eindringen von Allergenen. Noch ist jedoch unklar, ob Pollenproteasen die Tight junctions direkt zerstören oder ob die Schädigung auf einem indirekten Mechanismus beruht [15]. Fakt ist, dass infolge der proteolytischen Zerstörung der Tight junctions die schützende Epithelbarriere durchbrochen wird und schädigende Noxen wie auch Allergene in den Epithelverband vordringen und dort entzündliche bzw. allergische Reaktionen hervorrufen können [16].

4.3 Allergische Pollen-Reaktion versus nicht-allergische Pollenproteasen-Reaktion

Viele Pollenallergene weisen proteolytische Aktivität auf. Jedoch können auch nicht-allergene Pollenproteasen allergieähnliche Symptome hervorrufen. Die nicht-allergische Reaktion auf Pollenproteasen kann jedoch auch die Entwicklung einer Allergie begünstigen, indem die proteolytische Schädigung von Oberflächenepithelien der Bindehaut wie auch der Nasen- und Bronchialschleimhaut den Eintritt von Allergenen erleichtert. Die Pollenproteasen-Reaktion kann in diesem Kontext als Initiator einer allergischen Reaktion angesehen werden [16].

Während die immunologischen Prozesse der allergischen Typ-I-Reaktion [17, 18] auf Pollen großteils bereits erforscht sind, bleiben die genauen pathobiochemischen Vorgänge der nichtallergischen proteasenvermittelten Reaktion zurzeit noch unklar (Abbildung 34). Die mittels dem CASY1-System festgestellten zytomorphologischen Veränderungen der mit Pollenextrakt inkubierten CHANG-Zellen legen die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen Nekroseprozess handelt. In welcher Form sich die proteolytische Schädigung der Epithelzellen *in vivo* tatsächlich präsentiert wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

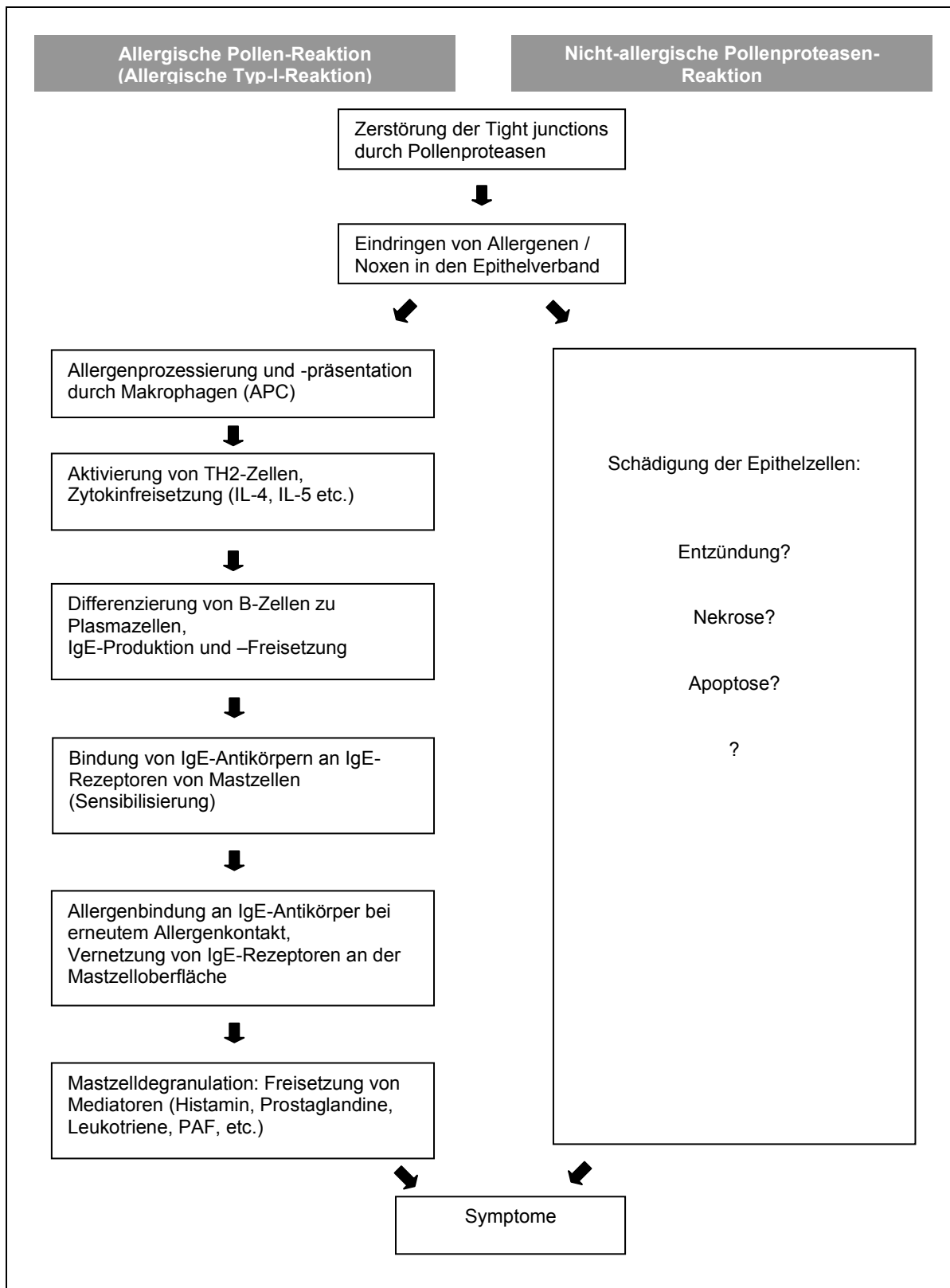


Abbildung 34: Allergische Pollen-Reaktion versus nicht-allergische Pollenproteasen-Reaktion

4.4 Therapieansätze

Wenn bei Patienten nachweislich eine Allergie gegen bestimmte Pollenspezies besteht, lindert die Behandlung mit Antiallergika (Antihistaminika, Cromoglycinsäure-Präparate etc.) bzw. eine Hyposensibilisierungstherapie lediglich die Beschwerden, die durch Pollenallergene hergerufen werden. Liegt bei Allergikern zusätzlich eine lakrimale Antiproteasendefizienz vor, sind die Symptome durch antiallergische Medikamente bzw. spezifische Immuntherapie allein nicht zu beherrschen.

Bei Patienten mit allergieähnlichen Beschwerden, bei denen jedoch keine Pollenallergie nachzuweisen ist, sind antiallergische Therapiemaßnahmen wirkungslos, da die Ursache nicht in einer allergischen Sensibilisierung des Organismus, sondern in einer proteolytischen Schädigung von Oberflächengrenzstrukturen liegt. Es ist daher sinnvoll, bei Patienten mit okulären bzw. nasobronchialen Reizerscheinungen und anamnestischem Hinweis auf einen Zusammenhang mit Pollenexposition eine Allergie-Diagnostik zu betreiben, bevor man sie einer antiallergischen Therapie zuführt.

Nicht-Allergiker als auch Allergiker, bei denen die herkömmliche antiallergische Behandlung unzureichend effektiv ist, bedürfen einer Therapie, welche die nicht-allergische Pollenproteasen-Reaktion einzudämmen vermag bzw. ihre Folgen verhindert.

Um solche Medikamente zu entwickeln, ist jedoch noch einiges an Forschungsarbeit zu leisten. Ein Ansatz wäre die Entwicklung von Augentropfen, die Antiproteasen bzw. Enzyminhibitoren beinhalten. Jedoch stellt sich hier das Problem der enormen Enzymvielfalt in Pollen. Die in Pollen enthaltenen Enzyme sind großteils noch nicht spezifiziert, was jedoch die Grundvoraussetzung für die Entwicklung solcher Präparate wäre.

Laborexperimentelle Versuche mit Doxycyclin haben gezeigt, dass dieses Präparat imstande ist, den durch Pollenproteasen verursachten proteolytischen Abbau von Proteinen des Nasensekrets zu verhindern [12]. Doxycyclin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline, das durch Blockade der 30S-Untereinheit die bakterielle Proteinsynthese hemmt [19, 20]. Zudem ist Doxycyclin auch ein Matrix-Metalloproteasen-Inhibitor und scheint die Expression von Proteasen und Antiproteasen zu beeinflussen [21, 22]. Inwieweit Doxycyclin bezüglich der Hemmung von Pollenproteasen auch am Patienten Wirkung zeigt, ist bisher noch nicht weiter untersucht worden.

Denkbar wäre auch der Einsatz von antiretroviralen Proteaseinhibitoren (Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir etc.), um der Pollenproteasen-Reaktion am Auge entgegenzuwirken. Proteaseinhibitoren als Bestandteil der antiretroviralen Therapie hemmen spezifisch die HIV-Protease. Dieses virale Enzym gehört zu den Aspartylproteasen und bewirkt in der Reifungsphase der Viruspartikel die Spaltung des viralen Polyproteins in verschiedene, für das Virus wichtige Proteine. Proteaseinhibitoren verhindern diese Spaltung und führen somit zur Bildung defekter Viruspartikel [19, 20]. Es gibt jedoch noch keine Evidenz dafür, ob sich diese bisher nur in der HIV-Therapie eingesetzten Aspartylproteaseinhibitoren auch zur Hemmung von Pollenproteasen eignen.

Der Zusatz körpereigener Antiproteasen, wie z.B. α 1-Antitrypsin, zu Tränenersatzpräparaten wäre ebenfalls vorstellbar. Jedoch ist auch dieser Ansatz zurzeit noch weitestgehend unerforscht.

Bis effektive Medikamente auf den Markt kommen, bleibt nur die Empfehlung allgemeiner Präventionsmaßnahmen wie z.B. sich nur beschränkt in pollenbelasteter Luft aufzuhalten und sich nach Aufenthalt im Freien das Gesicht und eventuell auch die Haare zu waschen. Zu Hause sollten die Betroffenen die Fenster geschlossen halten und erst nach Regenfall lüften sowie Möbel mit einem feuchten Tuch von Blütenstaub befreien. Zudem ist es ratsam, sich die Augen nach Pollenexposition mit einem (unkonservierten) Tränenersatzpräparat auszuspülen. Dieses sollte vorzugsweise keine Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) beinhalten, da Pollen vermutlich auch Enzyme enthalten, die imstande sind diese Cellulose zu spalten und das Tränenersatzpräparat somit seine Wirksamkeit einbüßt. Genaue Untersuchungen dazu sind jedoch noch ausständig.

5 Literaturverzeichnis

1. Brewitt H, Zierhut M. Trockenes Auge – Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. Heidelberg: Dr. Reinhard Kaden Verlag GmbH; 2001.
2. Wedrich A, Schmut O, Rabensteiner D. Trockenes Auge – Alles zum Sicca-Syndrom. Wien: Verlagshaus der Ärzte; 2009.
3. Sachsenweger M. Augenheilkunde. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003.
4. Lang GK. Augenheilkunde: Verstehen – Lernen – Anwenden. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1998.
5. Freyler H. Augenheilkunde. Wien, New York: Springer-Verlag; 1985.
6. Bucher O, Wartenberg H. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12th ed. Bern, Göttingen, Toronto, Seattle: Verlag Hans Huber; 1997.
7. Radlowski M. Proteolytic enzymes from generative organs of flowering plants. *J Appl Genet.* 2005; 46(3): 247-57.
8. Schmut O, Wolf H, Traunwieser E, Horwath-Winter J. Nicht-allergische Pollenreaktion am Auge. *Z prakt Augeheilkd.* 2009; in press.
9. Gunawan H, Takai T, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed. *Allergol Int.* 2008 Mar; 57 (1): 83-91.
10. Grogan DE, Hunt JH. Pollen proteases: their potential role in insect digestion. *Insect Biochem.* 1979; 9: 309-13.
11. Dhara N, Boldogh I, Cardenas V, Sur S. Role of pollen NAD(P)H oxidase in allergic inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008 Feb; 8(1): 57-62.
12. Wolf H. Destruction of nasal mucus proteins by pollen proteases. Dissertation at the Department of Ophthalmology, Medical University Graz; 2008.
13. Talamo RC. Basic and clinical aspects of the alpha1-antitrypsin. *Pediatrics.* 1975 Jul; 56(1): 91-99.

14. Gupta AK, Sarin GS, Mathur MD, Ghosh B. α 1-Antitrypsin and serum albumin in tear fluids in acute adenovirus conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 1988; 72: 390-3.
15. Cunha A. Effect of pollen extract of *Parietaria judaica* in epithelial pulmonary cells. Departamento de Bioquímica da Universidade de Coimbra: RNA Mensageiro - O jornal online de biociências. 2003 Feb 8; [cited 2008 Jun 24]; Available from: <http://www1.ci.uc.pt/rnam/artigos/004.htm>
16. Runswick S, Mitchell T, Davies P, Robinson C, Garrod DR. Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirology*. 2007; 12: 834-42.
17. Siegenthaler W. *Klinische Pathophysiologie*. 8th ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2001.
18. Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1998.
19. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. *Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag; 2006.
20. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Kortnig M. *Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2001.
21. Rossiter HB, Scadeng M, Tang K, Wagner PD, Breen EC. Doxycycline treatment prevents alveolar destruction in VEGF-deficient mouse lung. *J Cell Biochem*. 2008 May 15; 104 (2): 525-35.
22. Smith VA, Cook SD. Doxycycline - a role in ocular surface repair. *Br J Ophthalmol*. 2004 May; 88(5): 619–625.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eva-Maria Spreitzhofer
Geboren: am 30.01.1984 in Judenburg
Staatsbürgerschaft: Österreich

Studium und Schulausbildung

seit 10/2002: Studium Humanmedizin
Medizinische Universität Graz

06/2002: Matura mit ausgezeichnetem Erfolg am BG/BRG
Knittelfeld, Steiermark

Praktika während des Studiums

Pflichtfamulaturen im Rahmen des Praktischen Jahres (PJ):

12/2008 - 04/2009: Klinische Abteilung für Thorax- und Hyperbare
Chirurgie
Univ. Klinik für Chirurgie, Graz

11/2008 - 12/2008: Lehrarztpraxis für Allgemeinmedizin
Dr. med. univ. Susanne Kouba-Fechter, Graz

10/2008 - 11/2008: Univ. Klinik für Augenheilkunde, Graz

04/2008 - 07/2008: Klinische Abteilung für Gastroenterologie und
Hepatologie
Univ. Klinik für Innere Medizin, Graz

Pflichtfamulaturen (PF) im Rahmen des 2. Studienabschnitts:

03/2008: Univ. Klinik für Radiologie und Strahlentherapie, Graz

12/2007: Klinische Abteilung für Cardiologie
Univ. Klinik für Innere Medizin, Graz

07/2006: Univ. Klinik für Augenheilkunde, Graz

07/2005: Klinische Abteilung für Cardiologie
Univ. Klinik für Innere Medizin, Graz

07/2004: Klinische Abteilung für Thorax- und Hyperbare
Chirurgie
Univ. Klinik für Chirurgie, Graz