

## » Immunmikroskopischer Nachweis von Majorallergenen in Pollen von Wiesenlieschgras (*Phleum pratense L.*)

W. Sliwa-Tomczok<sup>1</sup>, J. Tomczok<sup>1</sup>, I. M. Dosch<sup>1</sup>,  
W. M. Becker<sup>2</sup>, H. Behrendt<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie  
und Allergologie GSF/TU München

<sup>2</sup> Forschungszentrum Borstel

Gräserpollen stellen die wichtigste Quelle von Außenluft-Allergenen dar. Die immunzytochemische Darstellung von Allergenen in Gräserpollen ist immer noch weitgehend unzuverlässig, obwohl einige Einzelarbeiten in diesem Bereich bekannt sind [1–4]. Der Nachweis von Allergenen in Pollen kann aufgrund der extrem hohen Wasserlöslichkeit der Allergene nur unter strikt wasserfreien Bedingungen gelingen. Daher war unser Ziel, neue Verfahren, vor allem Tieftemperatur-Verfahren, zu entwickeln, die aufgrund einer optimalen Konformationserhaltung des Epitopes die Visualisierung von Allergenen in situ erlauben.

Die Wiesenlieschgraspollen (Allergon, Välinge, Schweden) wurden wasserfrei entweder mit Acrolein-Dampf (Riedel-de-Haën, Seelze) oder mit Mischungen aus Glutaraldehyd (GA; 70%, EM grade; Polysciences, Warrington, PA., USA) und Paraformaldehyd (PFA; Sigma, St. Louis, Mo., USA) in 2,2-Dimethoxypropan (DMP; Sigma) fixiert. Eine Konzentration von 0,5% GA + 0,5% PFA in DMP 24 hr bei Raumtemperatur zeigte die besten Ergebnisse. Zur Lokalisierung der Allergene in Pollen wurden Kryoschnitte, Semidünnschnitte und gefriergebrochene Pollen mit monoklonalen Antikörpern (mAk IG 12 [5] gegen Phl p 1 bzw. mAk Bo 1 [6] gegen Phl p 5) inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden an FITC konjugierte Kanin-

chen-Anti-Maus-IG (DAKO, Hamburg) oder an Gold gekoppelte Kaninchen-Anti-Maus-IgG/M (Aurion, Wageningen, NL), mit Silberverstärkung verwendet.

Die Methoden zum Allergennachweis umfassten:

1. indirekte Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten für lichtmikroskopische Verfahren,
2. indirekte Immungold-Silber-Markierung an Gefrierschnitten und gefriergebrochenen Pollen für rasterelektronenmikroskopische Verfahren im JSM-6400F und JSM-6300 (JEOL, Tokyo, Japan) mit Sekundärelektronen(SE)- und Rückstreu(RE)-Detektoren,
3. indirekte Immungold-Silber-Markierung an Kunstharz-(Epon, LR-Gold und Lowicryl K4M) Semidünnschnitten für lichtmikroskopische und transmissionselektronenmikroskopische Verfahren.

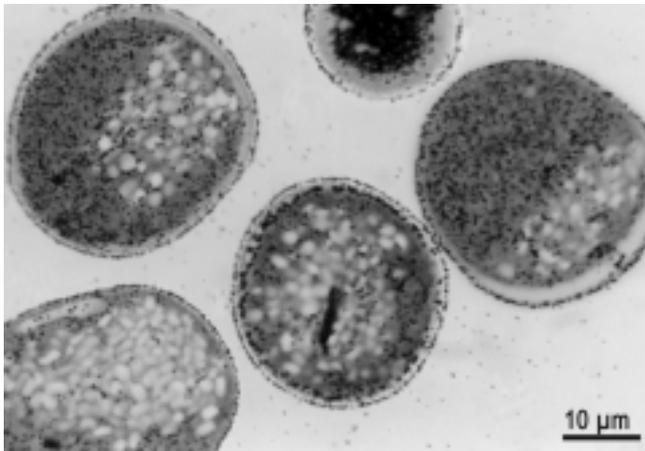
Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Pollen nach Entwässerung in aufsteigender Ethanolreihe und Kritisch-Punkt-Trocknung mit einer 10-nm-Goldschicht besputtert. Lichtmikroskopische Untersuchungen am Semidünnschnitt erfolgten sowohl im Durchlicht als auch mit Epipolarisation sowie am Kryoschnitt mit Epifluoreszenz. Die genauen Verfahrensabläufe zeigt Abb. 1.



**Abb. 1** Schematische Darstellung der angewendeten Methoden zum Allergennachweis in Pollen.

Im Ergebnis zeigte sich die beste Morphologie nach Fixierung in 0,5% GA + 0,5% PFA in DMP-24 hr bei RT. Es wurde keine positive Markierung gefunden bei Fixation mit Acrolein-Dampf und auch nicht bei Fixation mit GA bzw. GA + PFA (in DMP) in Konzentrationen > 0,5% GA.

Eine detaillierte Analyse der bevorzugten Lokalisationsorte der von uns nachgewiesenen Majorallergene Phl p 1 und Phl p 5 weist auf unterschiedliche Allergenverteilungsmuster hin: Phl p 1 zeigt sich im Bereich der äußeren Anteile der Intine und an der Pollenoberfläche im Porenbereich, während Phl p 5 vorwiegend in der zytoplasmatischen Matrix sowie in Zwischenräumen und Mikrokanälen der Exine erscheint (Abb. 2).



**Abb. 2** Immungold-Silber-Markierung von Phl p 5 Majorallergen am Semidünnschnitt. Fixation mit 0,5% GA + 0,5% PFA in DMP, LR-Gold-Einbettung bei  $-25^{\circ}\text{C}$  (Bild wurde publiziert: Behrendt et al. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 69).

Auf der Pollenoberfläche war die Phl p 5-Markierung nicht über die ganze Oberfläche gleichmäßig verteilt, sondern zwischen den Inseln des Tectums (spinulose exine) zu finden. Die räumliche Expression von Phl p 5 nach der Immungoldmarkierung weist auf eine „natürliche“ Freisetzung der Allergene durch Mikrokanäle der Exine auf die Pollenoberfläche hin.

Bei dieser Studie handelt es sich um

- die erste komplexe Studie zum Vergleich verschiedener Fixations-, Einbettungs- und Entwässerungsmethoden und Mikroskopieverfahren zur Darstellung von hochdiffusiblen Allergenen in Gräserpollen
- die erste Applikation der konventionellen- und Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie zur intrazellulären 3D-Darstellung von Hauptallergenen in Pollen von *Phleum pratense* L.

## Literatur

- <sup>1</sup> Behrendt H, Tomczok J, Sliwa-Tomczok W, Kasche A, Ebner von Eschenbach C, Becker WM, Ring J. Timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 414–418
- <sup>2</sup> Grote M, Dolecek C, Van Ree R, Valenta R. Immunogold electron microscopic localization of timothy grass (*Phleum pratense* L.) pollen major allergens Phl p I and Phl p V after anhydrous fixation in acrolein vapor. *J Histochem Cytochem* 1994; 3: 427–431
- <sup>3</sup> Singh MB, Taylor PE, Knox RB. Special preparation methods for immunocytochemistry of plant cells. In: Beesley JE, ed. *Immunocytochemistry. A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 1993: 77–102
- <sup>4</sup> Taylor PE, Staff IA, Singh MB, Knox RB. Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling. *Histochem J* 1994; 26: 392–401
- <sup>5</sup> Petersen A, Schramm G, Bufe A, Schlaak M, Becker WM. Structural investigations of the major allergen Phl p I on the complementary cDNA and protein level. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 987–994
- <sup>6</sup> Becker WM, Schaubschläger W, Westphal W, Schlaak M. Purification of grass pollen allergens by means of immobilized monoclonal antibodies. In: Chmiel H, Hammes WP, Baily JE, eds. *Biochemical Engineering*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1988: 440–442

Dr. rer. nat. W. Sliwa-Tomczok

KKG Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM  
Biedersteiner Str. 29  
80802 München