

Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs)

Fettsäuremetabolite aus Pollen mit ungeahnter Wirkung auf das menschliche Immunsystem

Cl. Traidl-Hoffmann¹, A. Kasche¹, V. Mariani¹, Th. Jakob¹, M. Müller², J. Ring³, H. Behrendt¹

¹ ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt, KKG-Umweltdermatologie und Allergologie GSF/TUM

³ Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Biederstein, Technische Universität München

² Julius von Sachs Institut, Universität Würzburg;

Schlüsselwörter

Pollen, Allergie, Umwelt

Zusammenfassung

Pollen sind als Allergenträger klar identifiziert und charakterisiert worden. Wir konnten kürzlich herausarbeiten, dass Pollen weitaus mehr als Allergenträger sind. Im feuchten Milieu setzen Pollen nicht nur Allergene sondern auch Lipidmediatoren frei. Diese Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) zeigten unterschiedliche Wirkungen auf Zellen der allergischen Immunantwort, wie z. B. chemotaktische Wirkung auf humane neutrophile und eosinophile Granulozyten. Die Analyse der Lipide in den wässrigen Pollenextrakten ergab verschiedene Produkte von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linol- und α -Linolensäure), die ebenfalls eine aktivierende Wirkung auf humane Granulozyten ausüben.

Neben diesen proinflammatorischen PALMs konnten wir in Pollenextrakten noch eine weitere Gruppe von Lipidmediatoren mit immunmodulierender Wirkung identifizieren. Diese bestand in einer Verminderung der LPS-induzierten Freisetzung von IL-12, dem Schlüsselzytokin in der Ausbildung von Typ1-T-Helferantworten (Th1). In der chemischen Analyse stellten sich diese Lipide als Autooxidationsprodukte der α -Linolensäure mit Prostaglandin-Ringstrukturen (Phytoprostane) dar. Es ist anzunehmen, dass die Freisetzung von immunmodulierenden PALMs (z. B. E₁-Phytoprostane) am Ort der Pollenexposition die Funktion dendritischer Zellen derart beeinflusst, dass bevorzugt Allergie-fördernde Th2-Immunantworten auf die gleichzeitig freigesetzten Pollenallergene abildet werden.

Pollen – die pflanzenbiologische Sichtweise

Der Name „Pollen“ wurde vom schwedischen Naturforscher Linnaeus 1760 geprägt. (vom lateinischen „Mehlstaub“) und steht für die Gesamtheit der Pollenkörner (1). Aus Sicht der Palynologie sind Pollen

Keywords

Pollen, allergy, environment

Summary

We recently demonstrated that pollen are far more than allergen carriers releasing bioactive lipid mediators (pollen associated lipid mediators – PALMs) upon contact with an aqueous phase. These mediators released by pollen (birch and grass) activate and recruit PMN *in vitro*. Pollen derived granulocytic chemotactic activity may be attributable to one or more lipids that are functionally and structurally closely related to leukotriens. Pollen-extracts contained substantial amounts of linolenic acid-derived hydroxy fatty acid derivatives namely 13-HODE and 13-HOTE which also lead to activation and migration of PMN.

Apart from these proinflammatory substances also immunomodulatory lipid mediators were identified. This immunomodulatory activity was shown by a block of the LPS/CD40-induced IL-12 p70 production in human monocyte derived dendritic cells leading also to an enhanced ensuing Th2-response. The chemical analysis revealed substantial amounts of the recently described phytosteranes of which the phytosteranes E₁ could be identified as one of the IL-12 reducing factors in aqueous pollen extracts. These results suggest that pollen derived lipid mediators play an important role in the modulation of dendritic cell function, and consequently in the nature of the corresponding T cell response.

Pollen associated lipid mediators

Träger des männlichen Erbguts höher entwickelter Pflanzen (Gametophyt). Sie sind zwischen 5 und 80 μ m groß und besitzen eine widerstandsfähige Hülle. Die Pollenwand teilt sich auf in die Intine, die vom Protoplast gebildet wird und aus Zellulose und Pektin besteht, und die äußere Exine, die vom Tapetum der Anthere abstammt und aus dem extrem widerstandsfähigen Sporo-

pollenin besteht. Das Zytoplasma des Pollen enthält neben den zytoplasmatischen Organellen wie Golgi-Apparat, Mitochondrien und endoplasmatischen Retikulum den generativen Zellkern, Stärkegranula und Polysaccharid-Partikel.

Anders als die übrigen Pflanzenzellen enthalten Pollenkörner keinen Chloroplasten und sind dementsprechend nicht fähig zur Photosynthese. Ihr heterotrophes Wachstum ist somit geprägt durch die Aufnahme von exogenen Energiequellen über das Stigma (2). Das Pollenkorn entsteht im Pollensack – der Anthere – und muss von dort, besonders bei den für die Allergologie bedeutenden windbestäubenden (amemphilen) Pflanzen (3), zum passenden Stigma transportiert werden, um sich dort mit dem weiblichen Fruchtknoten zu verbinden und einen Samen zu bilden.

Reife Pollen, die zum Zeitpunkt der Aussendung von der Anthere dehydriert sind, werden beim Auftreffen auf das feuchte Stigma rehydriert (4). Durch diesen erhöhten Innendruck quillt das Pollenkorn und kann somit den Pollenschlauch austreiben. Rehydrierte Pollen sind in der Lage innerhalb von 90 Sekunden nach dem Kontakt mit dem passenden Stigma einen Pollenschlauch auszubilden (5).

Pollen als Adjuvantien der allergischen Reaktion

Vor 131 Jahren gelang es Charles Blackley Pollen als Auslöser des Heuschnupfens zu identifizieren (6). Erst 90 Jahre später wurden Gruppe-1-Graspollen-Allergene biochemisch charakterisiert und analysiert (7). Heute wissen wir, dass pathophysiologisch

relevante Faktoren im Ablauf allergischer Erkrankungen Elemente wie das *priming* von Effektorzellen, deren Anlockung aus dem Blutkreislauf, die Stimulation von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und Mediatorfreisetzung beinhalten. Die gängige Lehrmeinung besagt, dass diese Effekte durch immunologische Überreaktionen auf spezifische Proteine – die Allergene – auf dem Boden einer genetischen Prädisposition verursacht sind und allergische Erkrankungen wie Bronchialasthma, allergische und Rhinokonjunktivitis nach sich ziehen. Unspezifische adjuvante Effekte bei der Allergieentstehung wurden bislang nur Umweltschadstoffen zugesprochen (8, 9). Dass Pollen jedoch selbst Faktoren freisetzen, die unspezifisch das innate oder adaptive Immunsystem aktivieren, ist völlig neu und konnte im Rahmen unserer Arbeiten eingehend analysiert werden.

Pollen als Allergenträger

Aus allergologischer Sicht zählen Pollen neben Pilzsporen und Säugetier-Epithelien zu den wichtigsten Allergenquellen der Außenluft. Bisher konnten allergene Komponenten der Pollen nur Proteinen oder Glykoproteinen zugeordnet werden, die bzgl. ihrer Masse zwischen 5–60 kDa rangieren (10). Das Wissen über die biologische Funktion der allergenen Proteine im Pollen selbst ist bislang begrenzt. Es konnte herausgearbeitet werden, dass sehr viele Allergene den so genannten *pathogenesis related proteins* (PRs) zuzuordnen sind (11, 12). PRs repräsentieren eine heterogene Sammlung von 14 Pflanzen-Proteinfamilien, die bei der Pflanzenabwehr oder der Resistenz gegen Umwelteinflüsse eine Rolle spielen (13). PRs sind auch verantwortlich für die Pollen-Frucht- oder Latex-Frucht-Kreuzreaktionen (14). Andere Allergene wurden den Strukturproteinen, den Profilininen, zugeordnet.

Derivate der Linol- und Linolensäure – die Bedeutung für die Pflanze

Pflanzen bilden sekundäre Naturstoffe, um sich vor Mikroorganismen und Fraßfeinden zu schützen. Sekundärstoffe gehören zur Grundausstattung einer Pflanze oder werden erst bei Bedarf, z. B. nach einer Verwundung, einem Kontakt mit Pathogenen oder abiotischem Stress gebildet. Bei der Reaktion von Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen auf bestimmte exogene Reize werden zunächst eine Reihe von intra- und extrazellulären Signalmolekülen gebildet, die den Sekundärstoffwechsel stimulieren. Eine wichtige Signalfunktion bei der induzierten chemischen Verteidigung kommt Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen vom Jasmonatyp zu (15, 16). Als Reaktion auf biotische Stimuli bilden Pflanzen Prostaglandin-ähnliche Verbindungen vom Isoprostantyp aus ungesättigten Fettsäuren (17). Diese Gruppe von Isoprostanoïden wurde kürzlich von Müller und Mitarbeitern in Pflanzen entdeckt (18). Pflanzliche Isoprostanoïde (Phytoprostane) werden durch freie Radikal-katalysierte Oxidation von Linolenat gebildet. Dabei entstehen mehrere Klassen von Phytoprostanen mit charakteristischem Prostaglandin-Ringsystem.

Linol- und Linolensäure und ihre monohydroxylierten Produkte aus Pollen – Kreuzreaktion mit Eicosanoiden

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass wässrige Pollenextrakte Eicosanoid-ähnliche Produkte enthalten (19). Da die Vorläufersubstanz der Eicosanoïde – die Arachidonsäure – nicht in Pollen enthalten ist, konnten die kreuzreagierenden Stoffe zwar strukturell ähnlich aber nicht identisch mit dieser Substanzgruppe sein.

Um die entsprechenden Substanzen zu identifizieren, wurde ein gesamt Lipidextrakt mit Hilfe der HPLC auf langkettige

Hydro(peroxy)fettsäuren untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Pollen einen hohen Anteil an nicht-veresterter Linol- und Linolensäure enthalten. Darüber hinaus konnten wir einen hohen Anteil der monohydroxylierten Linolensäurederivate (13-Hydroxy Oktadecadiensäure (13-HODE) feststellen und von der Linolensäure abstammende Derivate. Interessanterweise zeigen unterschiedliche Pollenspezies ein individuelles und spezifisches Muster dieser Derivate.

Auch in wässrigen Pollenextrakten wurden sowohl die nicht-veresterte Linolensäure (18:3) und Linolensäure (18:2) als auch ihre Derivate nachgewiesen. Dies zeigt, dass diese Substanzen – gleich wie die allergenwirkenden Proteine – in die wässrige Phase übergehen können und somit für den Menschen relevant sind.

Autoxidationsprodukte der Linolensäure – die Phytoprostane

Prostaglandin-ähnliche Substanzen. Phytoprostane, sind in höheren Pflanzen weit verbreitet. In unserer Studie analysierten wir in Zusammenarbeit mit Prof. M. Müller, Würzburg, erstmals detailliert Phytoprostane in wässrigen Extrakten von Birkenpollen. Interessanterweise fanden sich signifikante Konzentrationen von Phytoprostan E₁ (PPE₁) wobei PPF₁ und PPB₁ zwar vorhanden aber in sehr viel geringeren Konzentrationen detektiert wurden.

Lipidmediatoren aus Pollen – die Wirkung auf das angeborene Immunsystem

Pollen können neben der Freisetzung des Allergens auch direkt mit Zellen des innate Immunsystems interagieren. *In vitro* zeigte sich, dass sich Neutrophile (und auch Eosinophile) an Pollen anheften. In Zellfunktionsassays fanden wir, dass wässrige Extrakte von Birken- und Graspollen eine Migration von humanen Neutrophilen und Eo-

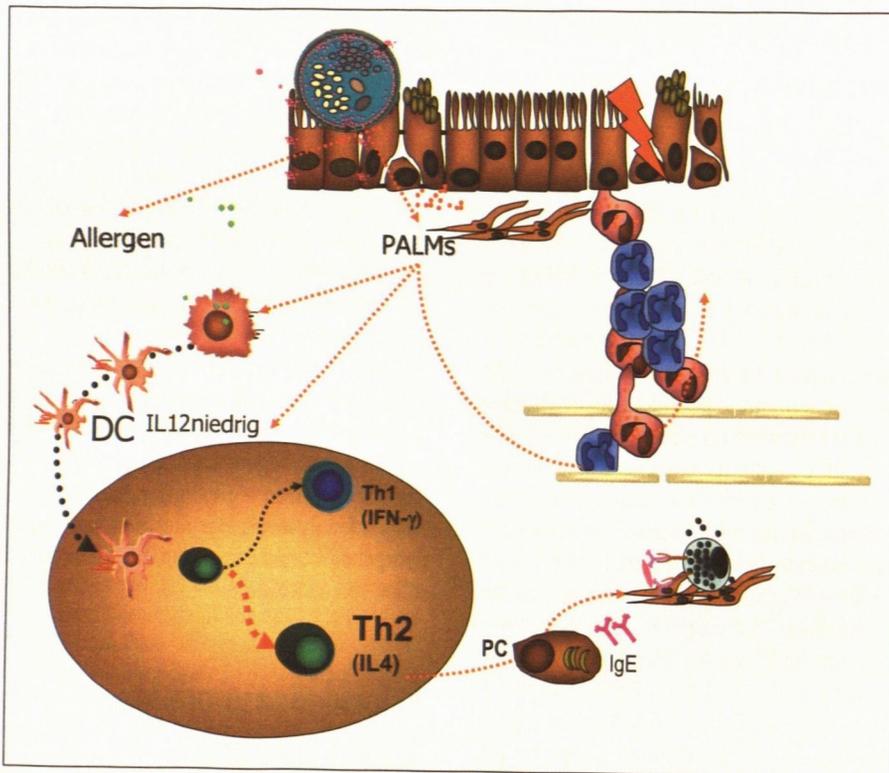


Abb. 1 Effekte von Pollen und Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) auf das innate und adaptive Immunsystem.

sinophilen induzieren (20, 21). Extrakte von Fichtenpollen waren sehr viel weniger chemotaktisch aktiv. Ob dies auch zu der bekanntermaßen geringeren „allergenischen Potenz“ von Fichtenpollen beiträgt, kann nur hypothetisch erwähnt werden. Darüber hinaus konnten diese Effekte sowohl für Allergiker als auch Nicht-Allergiker gezeigt werden. In weiterführenden Untersuchungen konnten wir die chemotaktische Aktivität der wässrigen Pollenextrakte den monohydroxylierten Produkten (z. B. 13-HODE, 13-HOTE) der Linol- und Linolensäure zuordnen.

Pollen scheinen demnach Mediatoren freizusetzen, die humane Granulozyten *in vitro* aktivieren und anlocken. Wenn ähnliche Effekte *in vivo* auf Haut oder Mukosa auftreten, könnte dies einen neuen, Allergen-unabhängigen Weg darstellen, der sowohl bei der Initiierung der Sensibilisierung als auch bei der Aggravierung der allergischen Reaktion eine Rolle spielt.

Immunmodulatorische Substanzen aus Pollen – die Bahnung für die allergischen Reaktion?

Eine allergische Reaktion auf Pollenallergene ist gekennzeichnet durch eine spezifische Immunreaktion, die mit der Bildung von T-Zellen mit einem charakteristischen Zytokinmuster einhergeht, das als T-Helfer-2-Zytokinmuster bezeichnet wird. Sehr wenig ist über den Mechanismus bekannt, der letztendlich zu der Induktion einer Th2-Antwort auf ein spezifisches Allergen führt. Einige Studien beschreiben Allergen-abhängige Mechanismen, andere hingegen zeigen T-Zell-abhängige oder individual-spezifische Faktoren. Dass jedoch Allergenträger selbst immunmodulierende Substanzen enthalten, ist für die Allergologie eine völlig neue Vorstellung.

In unseren Untersuchungen mit humanen dendritischen Zellen konnten wir zeigen, dass

diese Zellen – Vermittler der angeborenen und erworbenen Immunität – durch wässrige Pollenextrakte zu Reifung gelangen.

Interessanterweise führte eine simultane Stimulation von Lipopolysacchariden (LPS) mit steigenden Konzentrationen von wässrigen Pollenextrakten (*Bet.-APE*) zu einer dosisabhängigen Hemmung der LPS-induzierten IL-12-p70-Produktion, wohingegen die IL-6-Produktion unverändert blieb (22). Diese Aktivität der wässrigen Pollenextrakte konnte mit den Phytosterolen E_1 ebenfalls gezeigt werden, sodass diese pflanzlichen Bestandteile im Menschen eine immunmodulatorische Wirkung nach sich ziehen.

Pollen sind demnach viel mehr als nur Allergenträger. Die von Pollen auf der Schleimhaut freigesetzten Lipide ziehen neben dem spezifischen Effekt eine unspezifische Aktivierung und Allergie-fördernde Modulation des Immunsystems nach sich und bahnen somit den Weg für die Entwicklung einer allergischen Reaktion. Zu erwähnen bleibt, dass die von uns beobachteten immunstimulatorischen und immunmodulatorischen Effekte sowohl bei Allergikern als auch bei Nicht-Allergikern gefunden wurden. Dies führt zu der Umkehrung der

Fazit für die Praxis

Pollen gehören zu den wichtigsten aero-genen Allergieverursachern. Hier scheinen nicht nur Proteine, die Allergene, eine Rolle zu spielen, sondern auch bioaktive Lipidmediatoren (PALMs). Diese Pollen-assoziierten Lipidmediatoren kommen vermehrt in Pollen von umwelt-belasteten Bäumen vor und könnten für die höheren Allergieraten in belasteten Gebieten mit verantwortlich sein. PALMs wirken proentzündlich und immunmodulatorisch sowohl auf allergische als auch nicht-allergische Patienten. Ob diese Mediatoren zu Zeiten starken Pollenflugs für irritierende, nicht-allergische Schleimhautaffektionen des oberen Respirationstrakts mit verantwortlich sind, muss durch klinische Beobachtungen in epidemiologischen Studien bestätigt werden.

alten Frage, was einen Allergiker zum Allergiker macht zu dem Ausspruch: Was macht den Nicht-Allergiker zum Nicht-Allergiker. Während man früher sensibilisierte Patienten untersucht hat um zu klären, wie die Allergie entsteht, müssen wir anhand dieser neuen Befunde umdenken und uns fragen, welche Regulationsmechanismen in gesunden Probanden die Entstehung von Allergien verhindern.

Weitere wissenschaftliche Beobachtungen, wie z. B. der klare epidemiologische Zusammenhang zwischen kardiovaskulären und pulmonalen Erkrankungen und dem Pollenflug (23) lassen auf zusätzliche gesundheitsrelevante Wirkungen von Pollen schließen. Ob und inwieweit hierbei die von uns beschriebenen Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) eine Rolle spielen, bleibt abzuwarten.

Literatur

1. Knox RB. Pollen and Allergy. In: "Studies in Biology", The Institute of Biology (Hrsg.), Edward Arnold, London; 107: 1, 23–32, 51: 1979.
2. Stanley RG. Pollen. Biology – Biochemistry – Management. In Linskens HF (eds.): Berlin: Springer; 1974.
3. Kay AB. Allergy and allergic diseases. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344: 109–13.
4. Wolters-Arts M et al. Water-conducting properties of lipids during pollen hydration. *Plant Cell Environ* 2002; 25: 513–9.
5. Solomon WR. Airborne pollen: A brief life. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 895–900.
6. Blackley CH. Experimental researches on the causes and nature of Catarrhus aestivus (hayfever or hay-asthma). London: Dawson's of Pall Mall; 1959 (original publication: London: Balliere, Tindall & Cox; 1873).
7. Johnson P, Marsh DG. "Isoallergen" form rye grass pollen. *Nature* 1965; 206: 935–7.
8. Diaz-Sanchez D et al. Combined diesel exhaust particulates and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997; 158: 2406–13.
9. Krämer U et al. Traffic-related air pollution is associated with atopy in children with atopy in children living in urban areas. *Epidemiology* 2000; 11: 64–70.
10. Sonenthal KR, Shaughnessy MA. An overview of allergens. *Allergy Proc* 1993; 14: 106–7.
11. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 27–36.
12. Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 930–5.
13. Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1-type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 1999; 5: 85–97.
14. Yagami T. Allergies to cross-reactive plant proteins. Latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128: 271–9.
15. Thoma I et al. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J* 2003; 34: 363–75.
16. Thoma I et al. The isoprostanoic pathway in plants. *Chem Phys Lipids* 2004; 128: 135–48.
17. Mueller MJ. Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr Opin Plant Biol* 2004; 7: 441–8.
18. Mueller MJ. Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. *Chem Biol* 1998; 5: R323–33.
19. Behrendt H et al. Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 121–5.
20. Traidl-Hoffmann C et al. Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 831–8.
21. Plötz SG et al. Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 1152–60.
22. Traidl-Hoffmann C et al. Pollen associated phytoprostanes inhibit dendritic cell IL-12 production and augment Th2 cell polarization. *J Exp Med* 2005; 201: 627–36.
23. Brunekreef B et al. Relation between airborne pollen concentrations and daily cardiovascular and respiratory-disease mortality. *Lancet* 2000; 355: 1517–8.

Korrespondenzadresse:

Priv. Doz. Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann
Arbeitsgruppe Zelluläre Immunologie
ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt
Biedersteinerstr. 29
80802 München
Tel.: 0 89 / 41 40 34 72
Fax: 0 89 / 41 40 34 53
E-Mail: claudia.traidl-hoffmann@lrz.tum.de