Quantitative Analyse der inhibitorischen Wirkung spezifischer Antagonisten auf die basophile Aktivierung mittels BAT-Methode

Joakim, Dushi, BMA 22-25

Biomedizinische Analytik HF

ADR-AC GmbH

1. Zusammenfassung

Im Adverse Drug Reactions Analysis and Consulting (ADR-AC) wurde ein Basophilen-Aktivierungstest (BAT) -basiertes Protokoll etabliert, um die Aktivierung von Basophilen über unterschiedliche Signalwege (Klassisch und Komplementär) gezielt zu analysieren. Verschiedene Stimuli und spezifische Inhibitoren kamen zum Einsatz, um die Signalweg-spezifische Hemmbarkeit zu untersuchen. Die Resultate zeigen, dass eine gezielte Hemmung – wie sie für Ibrutinib und PMX-53 beobachtet wurde – eine differenzierte Kontrolle der basophilen Aktivierung ermöglicht, während der Inhibitor IC-87114 auch unspezifische Signalwege beeinflussen. JR14a konnte keine der Untersuchten Rezeptoren gezielt hemmen. Die Daten verdeutlichen die Notwendigkeit einer differenzierten Analyse bei unklaren BAT-Ergebnissen und legen die Grundlage für künftige methodische Entwicklungen.

2. Einleitung

Im ADR-AC zählt der BAT zu den Standardverfahren zur Diagnostik von Typ-I-Allergien. Basophile Granulozyten stehen hier im Fokus, da sie – ähnlich wie Mastzellen – nach Aktivierung eine Sofortreaktion auslösen können, die über Immunglobulin E (IgE) -vermittelte Mechanismen abläuft. Typ-I-Allergien gehören zu den allergischen Sofortreaktionen, bei denen der Beginn der Symptome oft innerhalb einer Stunde nach Allergenkontakt liegt und IgE als zentraler Trigger fungiert. Diese Antikörper sind auf der Oberfläche von Basophilen und Mastzellen gebunden und führen nach Kontakt mit spezifischen Allergenen durch Cross-Linking zur Degranulation und Freisetzung entzündungsfördernder Botenstoffe wie Histamin. [1] Bei der Freisetzung von Histamin wird die Granula an die Oberfläche der Zelle befördert, welche den Cluster of Differentiation (CD)-63 zeigen, welche Flowzytometrisch Quantifiziert wird. Je höher der Prozentsatz desto mehr Zellen sind Aktiviert. Allerdings können auch IgE-unabhängige, sogenannte pseudoallergische Reaktionen auftreten, beispielsweise durch Aktivierung komplementabhängiger Rezeptoren (C5a-C5aR), was für die Differenzialdiagnostik von Bedeutung ist. Der BAT ermöglicht die Untersuchung der Aktivierung von Basophilen, die nicht nur über den klassischen IgE / hochaffiner IgE-Rezeptor Typ I (FcεRI) Weg, sondern auch über komplementabhängige Rezeptoren oder unspezifisch, zum Beispiel durch das bakterielle Peptid N-Formylmethionin-leucyl-phenylalanin (fMLP) und dessen Rezeptor FPR1, ausgelöst werden kann, welches im BAT als Vitalitätskontrolle der Basophilen dient. [2] In diesem Experiment werden fMLP und IgE als Stimuli genutzt, um mehrere bekannte Aktivierungswege zu testen. Insbesondere bei unklaren oder IgE-negativen Testergebnissen ist die Identifikation alternativer Aktivierungswege von Relevanz.

3. Ziel und Fragestellung

Ziel ist es, die inhibitorische Wirkung spezifischer Antagonisten oder Inhibitoren Ibrutinib, IC-87114, JR14a und PMX-53 auf diese Aktivierungswege (IgE und Komplementvermittelt) zu quantifizieren.

Aus Diesem Ziel ergibt sich die folgende Fragestellung:

In welchem Masse können die entsprechenden Antagonisten oder Inhibitoren Ibrutinib, IC-87114, JR14a und PMX-53 diese Aktivierung hemmen?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Routinepatient:innen EDTA-Vollblut (mit >1,8 % Basophilen im Leukozytengate und >80 % CD63-positiver Reaktion auf IgE Kontrolle) wurde 30 Minuten bei 37 °C mit dem jeweiligen Inhibitor (Ibrutinib, PMX-53, IC-87114 oder JR-14) inkubiert. Anschliessend erfolgte gemäss BAT-Protokoll die Zugabe von Mastermix und eines der Stimuli (IgE, fMLP, C5a), gefolgt von einer weiteren Inkubation.

Die Proben wurden anschliessend lysiert, zentrifugiert und resuspendiert. Die Aktivierung der Basophilen wurde flowzytometrisch analysiert, um den Zusammenhang zwischen steigender Inhibitorkonzentration und abnehmender Zellaktivierung zu quantifizieren. Die Proben wurden mit dem NovoCyte der Firma Agilent Technologies gemessen. Das Gating entsprach dem etablierten BAT-Protokoll: Zunächst erfolgte die Auswahl der Singlets und Leukozyten, anschliessend wurden die Basophilen gegated. Aktivierung wurde über CD63 quantifiziert. Die Hintergrundwerte anhand der Negativkontrollen bestimmt (ca. 2 % Positivrate). Die Gates wurden falls erforderlich, individuell an die jeweilige Basophilenpopulation angepasst.

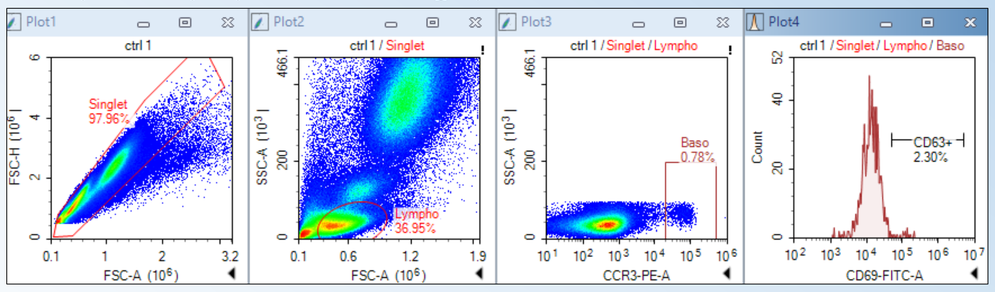


Abbildung 1 NovoExpress Darstellung der Messresultate einer Negativkontrolle (Dushi, 2025)

5. Ergebnisse/ Resultate

Tabelle 1: Prozent der Hemmunswirkung (Dushi, 2025)

	Ibrutinib	IC-87114	JR14a	PMX-53
IgE	-80%	-96.30%	4.60%	-0.50%
fMLP	21.40%	-78.30%	5.10%	0.10%
C5a	-1.20%	-71.20%	6.30%	-96.70%

Tabelle 1: Negative Werte = Hemmung, positive Werte = Steigerung der basophilen Aktivierung gegenüber Kontrolle. Ibrutinib hemmt insbesondere die durch IgE ausgelöste Aktivierung spezifisch, während PMX-53 selektiv die C5a-vermittelte Aktivierung stark hemmt. JR14a bewirkt bei allen Stimuli keine Hemmung. IC-87114 Hemmt alle Rezeptoren unspezifisch.

6. Diskussion

Die Resultate zeigen, dass eine gezielte Hemmung, wie bei Ibrutinib (speziell IgE-vermittelt) und PMX-53 (C5a-spezifisch) besonders vorteilhaft ist, da damit einzelne Signalwege effektiv und ohne unerwünschte Nebeneffekte auf andere Mechanismen blockiert werden. IC-87114 hemmt umfassend mehrere Wege, was das Risiko unspezifischer Hemmung birgt. Die fehlende Wirkung von JR14a verdeutlicht, dass dieser Inhibitor die Signalwege von IgE, C5a und fMLP nicht beeinflusst. Insgesamt gilt: Eine hohe Spezifität der Hemmung ermöglicht eine präzisere, sicherere Beeinflussung der basophilen Aktivierung und ist daher Diagnostisch besonders wünschenswert. Die Ergebnisse stützen sich auf eine begrenzte Probenzahl von 3 Proben. Variabilität zwischen Patient:innen oder potenzielle Effekte anderer Stimuli wurden nicht betrachtet. Die Bedeutung der Ergebnisse ist durch die niedrige Probenzahl begrenzt; weitere Studien notwendig.

Outlook

Zukünftige Arbeiten sollten sich auf die detaillierte Analyse der Signalmechanismen konzentrieren, um gezielter zwischen unterschiedlichen Aktivierungspfaden differenzieren und experimentell adressieren zu können. Nur bei IgE-vermittelten Allergien lässt sich durch Immuntherapie das Immunsystem umpolen. bei Pseudoallergien hilft dagegen nur der konsequente Verzicht auf den Auslöser.

Referenzen

[1] Santos et al., 2021

[2] Yin et al., 2024

Abbildungen

Abb. 1 NovoExpress Darstellung der Messresultate einer Negativkontrolle (Dushi, 2025)