Einfluss des Verhältnisses von spezifischen-IgE zu gesamt-IgE auf die Reaktivität von Basophilen

Livia Huber, BMA 21-24

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF, ADR-AC GmbH

1. Zusammenfassung

Eine allergische Reaktion kann durch eine Sensibilisierung gegen ein Allergen erklärt werden. Dabei können IgE-Antikörper spezifisch gegen das Allergen in Patientenseren gemessen werden. In vitro kann mit den Basophilen aus dem Vollblut eine Vernetzung von allergenspezifischen IgE-Antikörpern eine allergische Reaktion nachgestellt werden. Das ADR-AC führt dies mit einem Basophilen Aktivierungstest (BAT) durch. Eine Alternative dabei stellt der indirekte BAT dar. Dabei werden gut charakterisierte Spenderbasophile isoliert und mit Patientenseren getestet. Es soll erforscht werden, ob Spenderbasophile so verändert werden können, dass sie anschliessend mit einem Patientenserum resensibilisiert und durch eine Stimulation aktiviert werden können. Die Durchführbarkeit des indirekten BAT soll unter Verwendung von Bet-V1 als Modelallergen bestimmt werden.
Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigten, dass der indirekte BAT funktionieren kann, aber nicht reproduzierbar ist. In einer Donor:in konnte beobachtet werden, dass der Anteil von spezifischem Bet-V1 einen Einfluss auf die Reaktivität und die CD63 Hochregulierung hatte. Eine Endgültige Schlussfolgerung kann aber nicht gemacht werden, da dies nur bei einer Donor:in ersichtlich war.

2. Einleitung

Im ADR-AC wird für die Typ I Allergie Diagnostik der BAT durchgeführt, wobei Basophile Granulozyten im Fokus stehen. In vivo reagieren Basophile und Mastzellen ähnlich bei der Aktivierung, beide lösen eine Entzündungs-reaktion aus, die über eine Vernetzung der IgE vermittelt wird. [1]
Allgemein lassen sich Allergien aufgrund ihrer unterschiedlichen Pathomechanismen in Kategorien unterteilen. Die Typ I Allergien, die in dieser Arbeit von Bedeutung sind, werden auch Soforttyp genannt, da die Überempfindlichkeitsreaktion innerhalb von einer Stunde nach Kontakt mit dem Allergen auftritt. Dabei spielt IgE eine wichtige Schlüsselrolle. IgE befinden sich im Gewebe auf Mastzellen oder in der Blutbahn auf Basophilen Granulozyten. Allergene binden an die IgE, diese können durch ein Cross-linking die Zelle zum degranulieren bringen und Entzündungs-mediatoren, wie Histamin, freisetzen.[2]
Im Bereich der Forschung arbeitet das ADR-AC an einem indirekten BAT, welcher auch passiv BAT genannt wird. Bereits seit einiger Zeit wird an diesem Test gearbeitet. Beim indirekten BAT handelt es sich um eine adaptierte Version des klassischen BAT, der zusätzliche Vorteile bietet. Der wesentlichste Unterschied liegt darin, dass die Basophilen von bekannten, gut charakterisierten Donor:innen verwendet werden und von den Patient:innen ausschliesslich das Serum zugegeben wird. Serum ist Vollblut vorzuziehen, da es eine bessere Probenstabilität und Lagerung hat. Zudem ist eine Testung möglich, wenn eine Patient:in nicht über den IgE-vermittelten Weg reagieren kann.

3. Ziel und Fragestellung

Es soll erforscht werden, ob Spenderbasophile so verändert werden können, dass sie anschliessend mit einem Patientenserum resensibilisiert und durch eine Stimulation aktiviert werden können. Die Durchführbarkeit des indirekten BAT soll unter Verwendung von Bet-V1 als Modelallergen bestimmt werden.
Daraus ergibt sich folgende Forschungsfrage: Wie ist die Resensibilisierung der Spenderbasophilen mit spezifischem IgE aus Patientenseren und deren Reaktivität zu Bet-V1, gemessen an der CD63 Hochregulierung?

Referenzen
[1] Kawakami & Galli, 2022
[2] Fernandez, 2022, Abs. 1

Abbildungen
Abb. 1 Huber, L. (2024a). IgE Densität nach dem IgE-Stripping und der Resensibilisierung. medi.
Abb. 2 Huber, L. (2024b). Reaktivität der Basophilen nach dem IgE Stripping. medi.
Abb. 3 Huber, L. (2024c). Reaktivität der PBMC auf anti-IgE. medi.
Abb. 4 Huber, L. (2024d). Reaktivität (CD63) der Basophilen auf definierte Verhältnisse von anti-Bet-V1-IgE zu tIgE. medi.

4. Material, Methodik, Vorgehen

Von acht Donor:innen wurden jeweils 50ml Lithium-Heparin-Vollblut abgenommen. Daraus wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert, indem 15ml Lymphozyten separations Medium in zwei Tubes vorgelegt wurden. Anschliessend wurden diese mit dem Vollblut überschichtet und anschliessend zentrifugiert. Danach konnten die PBMC geerntet werden und es folgten einige Waschschritte. In einem nächsten Schritt wurden die IgE der Spenderbasophilen mittels Milchsäure entfernt (Stripping) und dann mit Tris neutralisiert. Es folgte eine Zellzählung und Vitalitätsmessung. Nachfolgend wurden die Zellen resuspendiert und 1:1 mit einem definierten Patientenserum (anhand tIgE oder sIgE ausgewählt) mit den Spenderbasophilen über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. In dieser Zeit konnte eine Resensibilisierung stattfinden. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen. Anschliessend folgte die Stimulation mit anti-IgE oder Bet-V1 für 30 Minuten. Anschliessend folgten Waschschritte, bevor die Zellen für die IgE-Dichte mit PE-CCR3 und anti-IgE APC oder für die Reaktivität mit PE-CCR3 und CD63 gefärbt wurden. Danach folgte die Messung am Durchflusszytometer.

5. Ergebnisse/Resultate

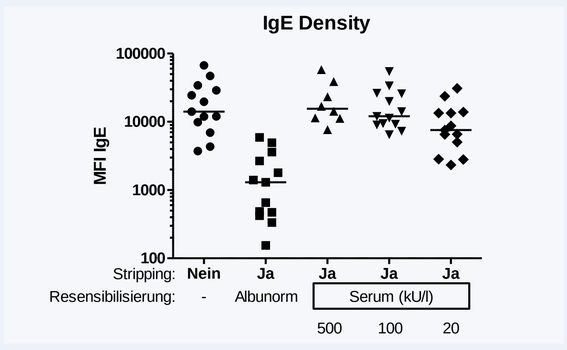


Abb. 1: IgE Densität nach dem IgE-Stripping und der Resensibilisierung (Huber, 2024a)

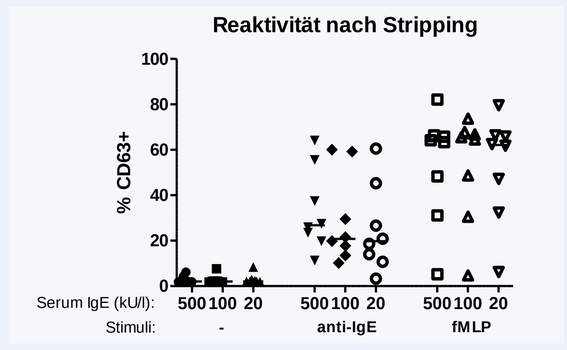


Abb. 2: Reaktivität der Basophilen nach dem IgE Stripping (Huber, 2024b)

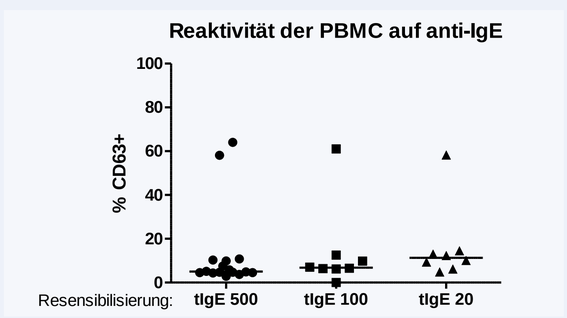


Abb. 3: Reaktivität der PBMC auf anti-IgE (Huber, 2024c)

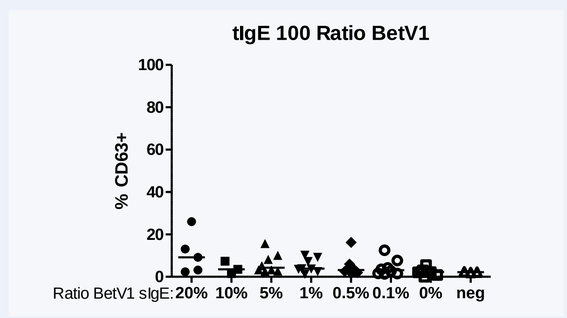


Abb. 4: Reaktivität (CD63) der Basophilen auf definierte Verhältnisse von anti-Bet-V1-IgE zu tIgE (Huber, 2024d)

6. Diskussion

Bei den ersten Durchführungen des indirekten BAT war klar ersichtlich, dass das IgE-Stripping und die Resensibilisierung gut funktioniert haben und erfolgreich reproduziert werden konnten (Abb. 1). Auf die anti-IgE-positiv Kontrolle zeigten die acht Donor:innen klare positive Reaktionen (Abb. 2). Bei dem zweiten Durchlauf unter der Verwendung der spezifischen Bet-V1 Patientenseren reagierte jedoch nur eine Donor:in auf die anti-IgE positiv Kontrolle (Abb. 3). Ebenfalls bei der Testung mit Bet-V1 als Stimulus reagierte nur eine Donor:in (Abb. 4). Die negativen Resultate des zweiten Durchlaufs waren sehr unerwartet. Es machte den Eindruck als würde ein Parameter fehlen, um die Reaktion zu unterstützen. Das technische Vorgehen und die Berechnungen wurden nochmals kritisch betrachtet, diese waren jedoch in Ordnung. Ein Problem bei der Resensibilisierung kann auch ausgeschlossen werden, da das Stripping und die Resensibilisierung funktionierten. Auch die Theorie, dass die Basophilen beim Strippen geschädigt wurden, kann ausgeschlossen werden, da nach diesem Schritt jeweils die Viabilität gemessen wurde, welche immer hoch ausfiel.
Schlussfolgerung: Das IgE-Stripping und die Resensibilisierung funktionieren. Künftig muss weiter an der Verbesserung der Reaktivität gearbeitet werden. Es konnte beobachtet werden, dass der Anteil von spezifischem Bet-V1 bei einer reagierenden Donor:in einen Einfluss auf die Reaktivität, die CD63 Hochregulierung, hatte. Eine endgültige Schlussfolgerung kann jedoch nicht gemacht werden, da dies nur in einer von acht Donor:innen ersichtlich war.