

Allergiediagnostik

Entwicklung verbesserter Methoden zur Diagnostik von Allergien

Projekt: Allergiediagnostik

Laufzeit: 01.01.2014 bis 30.07.2015

Gesamtprojektkosten: 40.000,00 €

Davon Förderung: 40.000,00 €

Projektleiter:

Prof. Dr. Ralf Lösel

Fakultät Angewandte Chemie

Technische Hochschule Nürnberg

Georg Simon Ohm

Die Typ-I-Allergie ist die häufigste Form einer Allergie. Sie entsteht nach dem ersten Kontakt mit einem Allergen, wobei ein Antikörper-Subtyp gebildet wird, der bei einem weiteren Kontakt zu allergischen Reaktionen führt. Die Diagnostik von solchen Typ I-Allergien ist durch zwei Methoden möglich. Zum einen durch den sog. Pricktest am Patienten, bei dem die Haut am Unterarm angeritzt wird. Im Anschluss wird eine Lösung mit Testallergenen auf die verletzte Stelle aufgetragen. Die Größe der daraus entstandenen Ödeme / Hautreaktionen lässt die Klassifizierung der Stärke einer Allergie zu. Die zweite Möglichkeit eine Allergie zu bestimmen, ist der Labortest. Hier wird dem Patienten zuerst Blut entnommen. Anschließend im Labor mit Extrakten aus Allergenen chemisch an eine feste Phase gekoppelt und die Antikörper im Blut gemessen. Abhängig von der Anzahl der Antikörper an den Allergenen, kann man auf die Ausprägung der Allergie schließen. Beide Verfahren können jedoch lediglich die Reaktion auf ein Allergen mit der Summe aller seiner Bestandteile bestimmen, nicht aber auf die einzelnen immunreaktiven Komponenten. Um aber bessere Prognosen und Therapie-konzepte entwickeln zu können, ist es wichtig, diese zu identifizieren. Die Schwierigkeit bei der Identifizierung ist jedoch, dass ein Allergen aus immunreaktiven und anderen Bestandteilen besteht, wobei der Großteil nicht zur Immunreaktion beiträgt. Hinzu kommt, dass dieser relative Anteil an immunreaktiven und nichtreaktiven Bestandteilen in einem Allergen von Person zu Person variiert. Eine Identifizierung der immunreaktiven Teile und deren Gesamtbeitrag zur allergischen Reaktion ist dennoch möglich. Gegen die immunreaktiven Bestandteile werden nämlich spezifische Antikörper ausgeschüttet, die erfasst werden können. Diese „component resolved diagnostics“ wird gegenwärtig mit separat auf molekularbiologischem Weg hergestellten Proteinen durchgeführt, was wegen des immensen Aufwands nur für einzelne allergene Substanzen machbar ist. Ideal wäre ein System, das die verschiedenen Bestandteile eines beliebigen allergenen Stoffes auftrennt und so die Reaktion der Antikörper des Patienten gegen jeden Bestandteil getrennt ermöglicht.

Ziele

Eine Möglichkeit die Reaktion der Antikörper des Patienten gegen jeden Bestandteil getrennt zu betrachten bietet die Methode des „Western Blots“. Hier werden Proteinmischungen

durch ein elektrisches Feld der Größe nach getrennt. Nach Übertragen der Bestandteile auf eine Membran kann die Immunreaktion und deren Quantifizierung erfolgen. Ein wesentlicher Nachteil bei dieser Methode liegt jedoch darin, dass eine Denaturierung der Proteinmoleküle der Allergene stattfindet. Hier verlieren die Allergene in den meisten Fällen ihre natürliche Struktur und werden in den meisten Fällen nicht mehr erkannt und somit „übersehen“. Ziel dieses Projekts war es, ein Western Blot Verfahren zu entwickeln, das die Proteine nicht denaturiert. Hierzu mussten zunächst effektive und milde Extraktionsverfahren identifiziert werden, um die immunreaktiven Bestandteile möglichst vollständig aus den Allergenen herauszulösen. Als nächstes Ziel galt es, ein Elektrophoresesystem zu entwickeln (Elektrophorese bezeichnet die Wanderung geladener kolloidaler oder gelöster Teilchen durch ein elektrisches Feld), das ohne denaturierende Stoffe eine hinreichende Trennung der Bestandteile ermöglicht. Die Eignung des neuen Verfahrens wird letztendlich daran gemessen, ob mit Hilfe des neuen Verfahrens Allergene identifiziert werden können, die mit dem klassischen Western Blot nicht darstellbar sind. Als Modellsysteme wurden die sehr häufig allergenen Pollen von Hasel, Erle, Birke und Roggen gewählt.

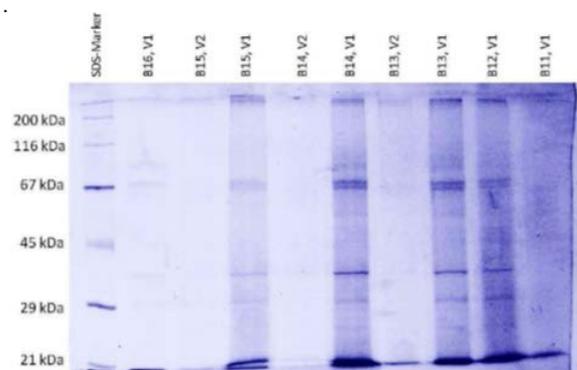


Abb. 1: SDS-Elektrophoresesegel, verschiedener Extrakte aus Birkenpollen, teilweise in verschiedenen Verdünnungsstufen. Deutlich erkennbar ist die hohe Trennschärfe, erkennbar an scharfen und schmalen Banden. Links: Molekulargewichtsstandard.

Projektverlauf

In der Literatur sind zahlreiche Extraktionsverfahren beschrieben. Unter Verwendung stark wirkender Detergenzien

(Reinigungsmittel) können nahezu alle Bestandteile aus den Rohallergenen herausgelöst werden. Diese sind in diesem Projekt jedoch nicht einsetzbar, da sie die Allergene in der Regel denaturieren. Daher wurden andere Extraktionsverfahren, beginnend mit Reinstwasser, evaluiert. Die so extrahierten Proteine wurden anhand der Gesamtmenge und ihrer Zahl und Stärke der immunreaktiven Banden mit einem Serum eines Patienten verglichen. Neben Reinstwasser und Pufferlösungen wurden verschiedene Detergenzien wie Tween 20, Triton X-100, CHAPS und CTAC eingesetzt. Anschließend wurden die Extrakte mit Hilfe der Elektrophorese analysiert. Zu Beginn des Projekts fand zu Vergleichszwecken die Elektrophorese nach der Standardmethode mit SDS statt. Die SDS-PAGE ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, einer analytischen Methode der Biochemie zur Trennung von Stoffgemischen nach der Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Dieses Verfahren führt zu scharfen Proteinbanden und ist daher in der Lage, auch sehr komplex zusammengesetzte Proben in Einzelbestandteile aufzutrennen (siehe Abbildung 2). Aufgrund der denaturierenden Eigenschaften von SDS wurde diese Technik jedoch nur eingesetzt, um die Extraktionseffizienz der verschiedenen Verfahren zu bewerten. Anschließend wurden auf Basis bereits beschriebener Verfahren Methoden entwickelt, die den bekannten Nachteil nichtdenaturierender Elektrophorese-techniken (geringe Trennschärfe) kompensieren. Die durch nichtdenaturierende Elektrophorese aufgetrennten Extrakte wurden dann auf Nitrocellulose-Membranen übertragen und mit dem Serum zweier Spender mit klinisch gut dokumentierter Allergie gegen diese Pollenarten inkubiert. Die Bandenmuster der verschiedenen Extrakte wurden danach verglichen und bewertet.

Ergebnisse

Reinstwasser war erwartungsgemäß kaum in der Lage nennenswerte Mengen an Protein herauszulösen. Verschiedene Pufferlösungen erwiesen sich als lediglich geringfügig besser. Der Nachteil dabei war, dass bei steigendem pH-Wert zwar mehr Proteine gelöst werden konnten, was aber nicht unbegrenzt möglich war, da eine steigende Denaturierung im stark alkalischen Milieu stattfand. Somit war kein Nachweis mehr möglich. Milde Detergenzien, vor allem das Alkylphenolethoxylat Triton X100, verbesserten die Extraktion dagegen erheblich. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass es möglich ist, Einzelallergene schonend aus ihren natürlichen Quellen zu extrahieren und sie ebenfalls ohne Denaturierung aufzutrennen. Allerdings gibt es kein universell ideales Protokoll. Je nach Allergen erwiesen sich unterschiedliche Methoden als optimal. In vielen Fällen waren Einzelallergene allerdings nur nachweisbar, wenn die Elektrophorese mit demselben Detergenz durchgeführt wurde wie die Extraktion. Die Auflösung mit der die Bestandteile aufgetrennt werden können, ist allerdings immer noch etwas schlechter, als mit der konventionellen SDS- Elektrophorese. Die im Rahmen

Projektleiter
 Prof. Dr. Ralf Lösel
 Telefon: 0911/5880-1527
 E-Mail: ralf.loesel@th-nuernberg.de

Fakultät
 Angewandte Chemie
 Technische Hochschule Nürnberg
 Georg Simon Ohm

www.th-nuernberg.de

des Projekts gewonnenen Ergebnisse bzw. das dabei entwickelte Verfahren zur Trennung von Allergenen und anschließender Immundetektion lässt zumindest für die Allergene Birke und Roggen einen diagnostischen oder wissenschaftlichen Nutzen erwarten. In einem nächsten Schritt müssen die gewonnenen Ergebnisse an einer größeren Zahl von Patientenproben verifiziert werden.

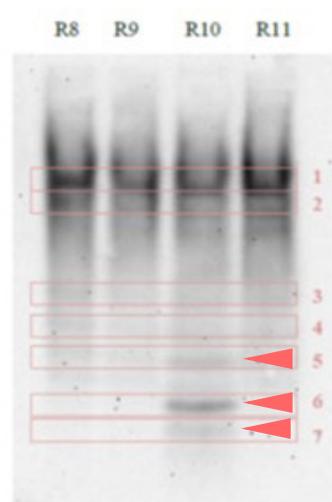


Abb. 2: Extrakte aus Roggenpollen, die nach verschiedenen Methoden gewonnen wurden. Die Pfeile markieren Bestandteile, die nur mit dem optimalen Verfahren herausgelöst werden konnten.



STAEDTLER
 STIFTUNG