

Klinische Diagnostik

Biotechnologische Strategien in der Allergiediagnostik

CHRISTIAN GROTE-WESTRICK, TOBIAS FISCHER, DOMINIK JUNGEN
BDL LABORDIAGNOSTIK GMBH, MÜNSTER

Allergies are on the rise in Europe: every hour a patient dies as a result of allergic asthma. Undervalued allergy is now perceived as a serious disease, which requires high-precision diagnostics and therapies. Especially in allergy diagnostics biotechnological processes play an important role, since recombinant production of major and minor allergens enhance specificity of current detection systems and allow new optimization strategies in immunotherapy.

DOI: 10.1007/s12268-012-
© Springer-Verlag 2012

■ Allergien stellen ein erhebliches Gesundheitsproblem in Industriestaaten dar. Die Zahl der unter allergischen Symptomen leidenden Patienten wächst zunehmend. Mehr als 80 Millionen Menschen und damit mehr als 40 Prozent der europäischen Gesamtbevölkerung leiden momentan an allergischen Symptomen [1].

Die Gründe für diese rasante Entwicklung dieser immunologischen Fehlleitung des Immunsystems sind vielseitig. Als Hauptgründe werden vermutet: (1) globale Erwärmung (Verlängerung des jährlichen Pollenflugs); (2) veränderte Vegetation (geografische Verschiebung von Allergenen, wie z. B. das Beifußblättrige Traubenkraut); (3) veränderte Hygienebedingungen innerhalb der letzten 50 Jahre; (4) zunehmende Umweltverschmutzung (aggressivere Pollen von Pflanzen an stark befahrenen Straßen) [1].

Die Weltgesundheitsorganisation hat Allergien als schwere Erkrankung klassifiziert.

Diagnose von Allergien

In der Regel besteht die finale Diagnose aus einem Gerüst von Einzelnachweisen für das Vorhandensein einer Allergie. Dazu gehört die individuelle Anamnese des Patienten, welche häufig über einen Fragebogen initiiert wird. In diesem werden Expositionen am Arbeitsplatz und im häuslichen Umfeld, Kontakt zu Haustieren oder genetische Prädis-

positionen identifiziert. Aus diesem Zusammenhang ergeben sich meistens erste Indizien für potenzielle Allergieauslöser, welche in maßgeschneiderten *in vitro*-Testsystemen für den jeweiligen Patienten überprüft werden. Ein Beispiel für einen Befund nach einer *in vitro*-Untersuchung ist in **Abbildung 1** dargestellt. Hinzu kommen *in vivo*-Untersuchungen wie der Hauttest (Exposition des Allergens auf penetrierter Hautoberfläche) oder Provokationstest, bei denen die Allergene direkt mit dem Patienten in Kontakt gebracht werden. Der alleinige *in vitro*-Test muss also die klinischen *in vivo*-Tests bestätigen und bei fehlender Plausibilität überprüft werden. Die Ergebnisse dieser Testreihen dienen als Bausteine für die finale Diagnose und sind ausschlaggebend für eine potenzielle spezifische Immuntherapie [2].

Aktuelle Systeme in der Allergiediagnostik

Aktuell existieren zahlreiche Bestimmungsmethoden zum Nachweis von spezifischen IgE (sIgE) im Humanserum [3]. Es handelt sich hierbei vor allem um *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [4], [5], Radioimmunoassays (RIA), Fluoreszenzimmunoassays (FIA), Blotverfahren und in jüngster Zeit auch Testsysteme in Form von Biochips. Je nach Anwendungsform können die Analyseme-

thoden in quantitativ, semiquantitativ und qualitativ eingeteilt werden.

Im Fall des ELISA – oder vergleichbaren Systemen (RIA, FIA) – wird das Allergen an eine Festphase gebunden und dadurch immobilisiert oder in Form von markierten Flüssigallergenen (Enzym oder Biotin) eingesetzt. Für Festphasen eignen sich Mikrotiterplatten, Papierscheiben oder auch Mikropartikel mit hoher Oberflächenkapazität, um eine möglichst hohe Wiederfindungsrate des sIgE zu ermöglichen. Nach Kopplung der Allergene an die Festphase erfolgt die Zugabe des Patientenserums und dadurch die Bindung von allergenspezifischen Antikörpern. Diese können durch Zugabe eines markierten Anti-Human-IgE-Antikörpers nachgewiesen werden. Je nach Markierungsform (fluoreszierend, radioaktiv, enzymgekoppelt) erfolgt die Messung direkt über Radioaktivität, Fluoreszenzaktivität oder photometrisch nach Zugabe eines Substrates über die enzymatische Farbreaktion.

Bei der Verwendung von markierten Flüssigallergenen werden zunächst die gesamten sIgE aus dem Patientenserum an der Festphase immobilisiert und anschließend das markierte Allergen zugegeben. Liegt eine Markierung mit Biotin vor, kann die Quantifizierung des spezifischen humanen IgE nach Inkubation mit Streptavidin-Enzym-Konjugat erfolgen. Bei vorliegender Enzymmarkierung wird die Farbentwicklung nach Inkubation mit dem jeweiligen Substrat detektiert. Bei beiden genannten Nachweissystemen korreliert die Höhe des jeweiligen Signals direkt mit der Menge an spezifischen allergengebundenen IgE aus dem Serum.

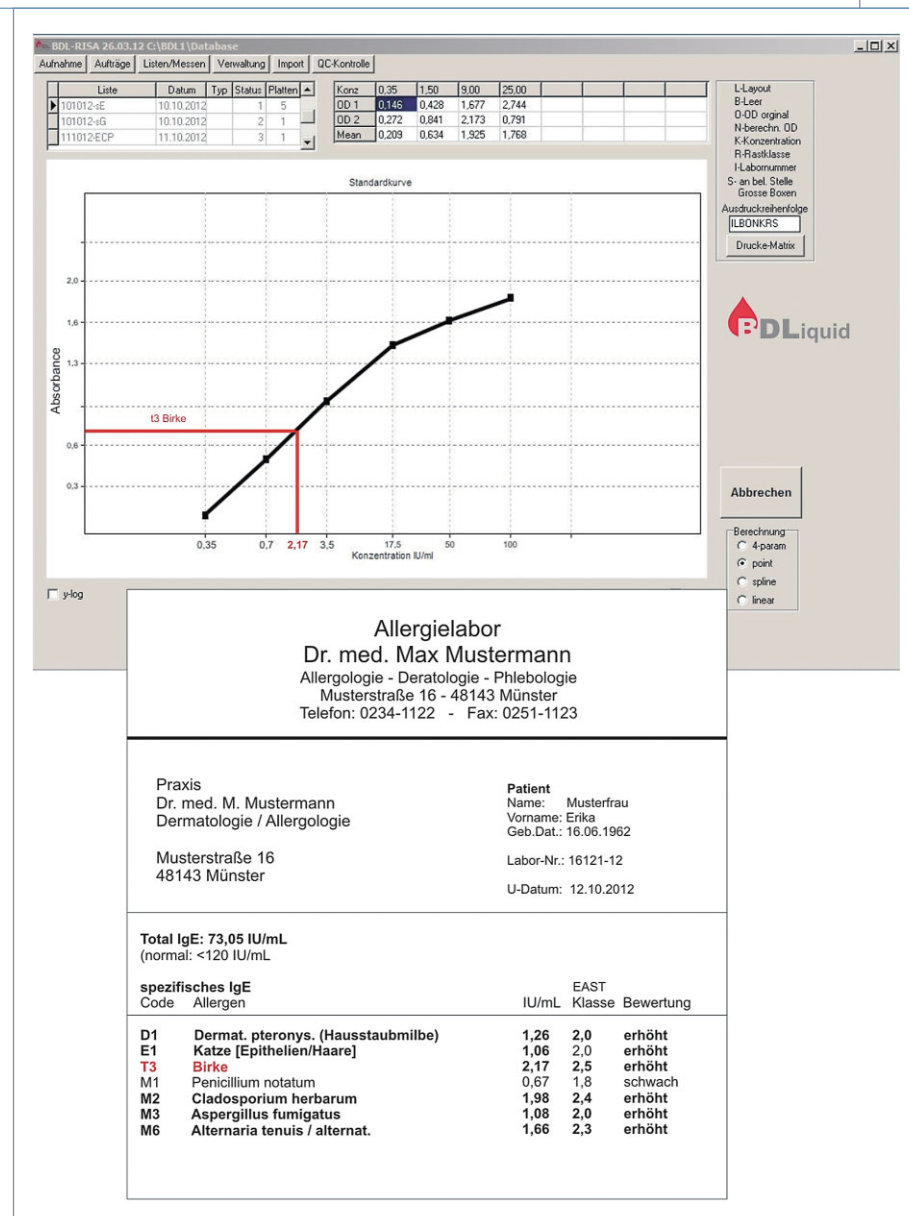
Die Streifen-tests (*lateral flow assay*) können sowohl semiquantitativer als auch qualitativer Ausrichtung sein und gehören zu den Blotverfahren (Dot Blot oder Western Blot). Als Basis werden Papierstreifen (z. B. Nitrocellulose) mit aufgetrennten oder nicht aufgetrennten Allergenen beschichtet und diese dadurch immobilisiert. Nach Zugabe von Patientenserum erfolgt die Bindung von sIgE-Antikörpern an die Allergene. Der entstan-

dene Komplex wird durch eine Farbreaktion detektiert und kann, je nach Anwendungsgebiet, mit einer Farbskala semiquantitativ ausgewertet werden. Ein deutlicher Vorteil des vorliegenden Testsystems ist die vergleichsweise einfache Anwendung und Auswertung, wohingegen sich die Standardisierung und Quantifizierung aufgrund der semiquantitativen Auswertung als schwierig darstellt.

Die Biochips (Mikroarrays) ermöglichen eine simultane Messung spezifischer IgE-Antikörper gegen ein breites Spektrum an Allergenen in einem Test. Die hoch aufgereinigten nativen oder rekombinanten Allergene werden hierfür auf dem Biochip immobilisiert. Nach Zugabe des Patientenserums binden die sIgE am Allergen und werden durch einen weiteren, meist fluoreszenzmarkierten Antikörper (Anti-Human) detektiert. Im Vergleich zu den oben genannten Testsystemen, in denen überwiegend Allergenextrakte zum Einsatz kommen, wird für Mikroarrays eine Vielzahl an Einzelallergenen benötigt. Weitere Nachteile sind die volle Automatisierung und dadurch bedingt eine geringe Fehlerüberwachung und die klinische Relevanz bezüglich einer Sensibilisierung gegenüber den getesteten Einzelallergenen. Deutliche Vorteile des Einsatzes von Biochips sind die überschaubaren Kosten, der niedrige Arbeitszeitaufwand und das geringe Volumen an Patientenserum für eine Analyse.

Rekombinante Proteine in der Allergiediagnostik

Rekombinante Proteine sind heutzutage für die moderne molekularbiologische Diagnostik, sowohl unter ökonomischen als auch unter qualitativen Gesichtspunkten, essenziell. Biologisches Material, welches aus Naturstoff- oder Zellextrakten durch klassische biologische Verfahren gewonnen wird, leidet in der Anwendung häufig unter einer zu geringen Spezifität, das heißt dem Vermögen, einen Analyten in einer Mischung von verschiedenen Analyten störungsfrei zu bestimmen. Durch den Einsatz rekombinanter Proteine können im Vergleich zu jenen diagnostischen Systemen, die mit Extrakten (also Proteinmischungen) arbeiten, verbesserte Anwendungen realisiert werden. Hier lässt sich die Präzision deutlich steigern, da nun das Prinzip *one well – one antigen* Anwendung findet. So auch in der Allergiediagnostik: Sämtliche klinischen Diagnostika basieren auf dem Prinzip von Allergenextrakten (z. B. von Birkenpollen), die als Beschichtungsrea-

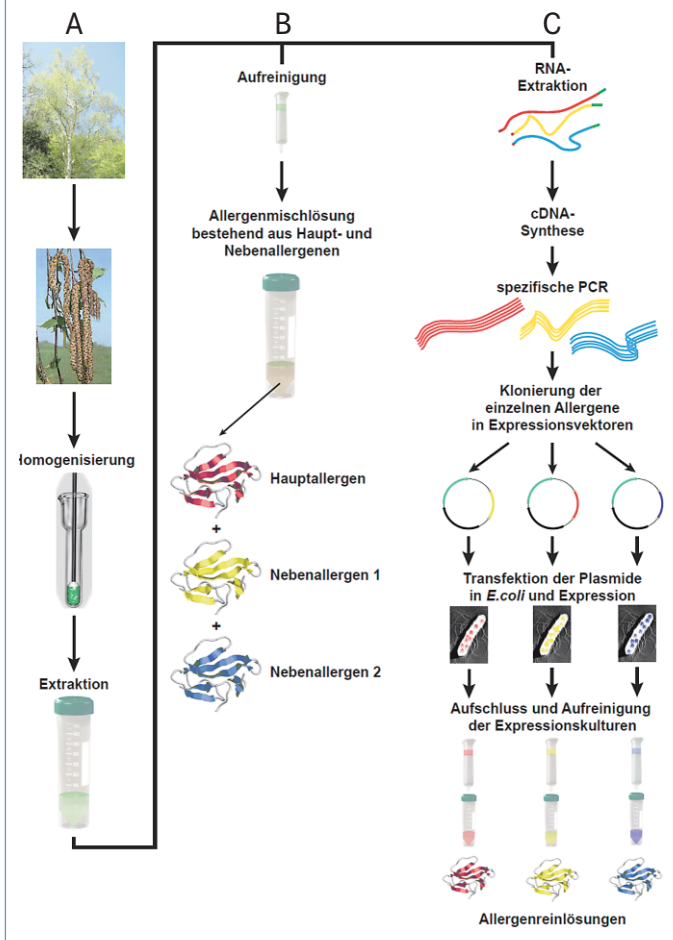


▲ **Abb. 1:** Befund nach *in vitro*-Untersuchung eines Patienten mit Verdacht auf Birkenallergie (Code: T = trees). Nach der Anamnese des Patienten vermutete der Arzt ebenfalls allergische Reaktionen auf Schimmelpilze (M = moulds) und Milben (D = dust mites). Die quantitative Bestimmung des IgE-Titers gegen diese Allergene (spezifisches IgE) erfolgte mit einer Standardreihe definierter IgE-Konzentrationen und der Einordnung der gemessenen Patienten-Absorbance in die Kalibrationskurve. Zur Plausibilitätskontrolle wird der Gesamt-Titer an IgE gemessen (Total IgE). Durchgeführt mit dem BDLiquid®-Test und der Analyse-Software BDL-RISA® (BDL Labordiagnostik).

genz potenzielle Allergie-verursachende IgE binden sollen. Da hier mit Proteinmischungen aus Haupt- und Nebenallergenen gearbeitet wird, lässt sich eine allergische Reaktion auf eine Haupt- oder Nebenkomponente nicht beurteilen.

Dies lässt sich mit der rekombinanten Herstellung von Proteinen präzisieren. Hierzu werden zunächst selektiv die Hauptallergene bzw. die Nebenallergene nach einer RNA-Extraktion aus biologischem Material mittels einer PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und in cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wird in einen geeigneten Expressionsvektor integriert, wodurch dem Allergen

zusätzlich noch verschiedene nützliche Attribute, beispielsweise Tags für die Aufreinigung (z. B. His- oder Hämagglutinin-Tag) oder Biotinylierung, angefügt werden können. Der Vektor wird daraufhin in einen Organismus bzw. in Zelllinien (z. B. *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* oder CHO-Zellen) transformiert bzw. transfiziert. Der Expressionsorganismus sollte hierbei nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgesucht werden. Zwar ist eine Expression in Bakterien relativ kostengünstig und führt in der Regel zu hohen Ausbeuten, allerdings auf Kosten essenzieller posttranslativer Modifizierungen und möglicherweise korrekter Faltung der Proteine.



◀ **Abb. 2:** Prinzip des klassischen Verfahrens der Allergenaufbereitung im Vergleich zur gentechnischen Herstellung am Beispiel der Haupt- und Nebenallergene der Birke. **A,** Das biologische Rohmaterial (hier Birkenpollen) wird homogenisiert und in einem Extraktionspuffer aufgeschlossen. **B,** Beim klassischen Verfahren wird das Rohextrakt aufgereinigt. Die finale Allergenlösung enthält sowohl die Haupt- wie auch Nebenallergene der Birke. **C,** Bei der gentechnischen Herstellung wird aus dem Rohextrakt die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels spezifischer Primer können sowohl die Haupt- als auch die Nebenallergene mittels PCR aus der cDNA amplifiziert werden. Die einzelnen PCR-Produkte werden nachfolgend in Expressionsvektoren kloniert und für die Expression in Bakterien (z. B. *Escherichia coli*) transfiziert. Nach Austestung verschiedener Klone werden die Allergene in größerem Maßstab in den Bakterien exprimiert. Mithilfe von geeigneten Tags (z. B. His-, Hämagglutinin-Tag), welche Bestandteil der Vektoren sind, können die Allergene nach Aufschluss chromatografisch aufgereinigt werden. Mit dem gentechnischen Verfahren können somit gezielt Haupt- und Nebenallergene für die Austestung von Patientenserum rekombinant hergestellt werden.

gesteigerter Präzision führen. Gerade in Multi-Parameter-Analyseverfahren, wie z. B. der Transplantations- oder Autoimmundiagnostik, stellen gentechnisch hergestellte Proteine einen unverzichtbaren Beitrag zur Verbesserung der Patientenversorgung dar. ■

[3] Renz H, Biedermann T, Bufe A et al. (2009) In-vitro-Allergiediagnostik. In: Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin e. V. (DGAKI)
 [4] Aas K, Johansson SG (1971) The radioallergosorbent test in the in-vitro diagnosis of multiple reagenic allergy. A comparison of diagnostic approaches. *J Allergy Clin Immunol* 48:134-142
 [5] Wide L, Bennich H, Johansson SGO (1967) Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet* 290:1105-1107

Korrespondenzadresse:
 Dr. Christian Grote-Westrick
 BDL Labordiagnostik GmbH
 Bahnhofstraße 44
 D-48143 Münster
 Tel.: 0251-162-53-24
 Fax: 0251-162-53-18
 grote-westrick@bdl-muenster.de
 www.bdl-muenster.de

Nach erfolgter Selektionierung der transformierten Klone kann die Expression des Allergens spezifisch induziert werden. Das Allergen wird daraufhin im jeweiligen Organismus bzw. der Zelllinie exprimiert und akkumuliert, entweder intrazellulär oder es wird je nach Vektor ins Periplasma bzw. das umgebende Medium freigesetzt. Das rekombinante Allergen kann anschließend chromatografisch aus den Zellen bzw. dem Medium in mehreren Stufen aufgereinigt und für *in vitro*-Testverfahren verwendet werden (**Abb. 2**).

Die erweiterte Diagnostik basierend auf rekombinanten Allergenen ermöglicht es, Kreuzsensibilisierungen nachzuweisen, therapeutische Strategien zu optimieren und den Erfolg laufend zu kontrollieren. Auch an der Entwicklung von spezifischen Immuntherapien mit rekombinanten Allergenen, die eine besser auf den Patienten zugeschnittene Immuntherapie erlauben, wird aktuell intensiv geforscht [2].

Ausblick

Maßgeschneiderte Therapien haben einen hohen Stellenwert in der Medizin, da sie Komplikationen durch Folgeerkrankungen weitestgehend minimieren. Nicht nur in der Allergiediagnostik und der spezifischen Immuntherapie werden rekombinante Proteine zu

Literatur

[1] D'Amato G, Cecchi L, Bonini S et al. (2007) Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy* 62:976-990
 [2] Valenta R, Campana R, Marth K et al. (2012) Allergen-specific immunotherapy: from therapeutic vaccines to prophylactic approaches. *J Intern Med* 272:144-157



Christian Grote-Westrick

Jahrgang 1980. Biochemiestudium an der Universität Bochum. 2004 Diplomarbeit an der Harvard Medical School, Boston, USA. 2007 Promotion in Bochum und Yale School of Medicine, New Haven, USA. 2007-2010 Project Manager imusyn GmbH & Co. KG, Hannover. 2010-2011 Produktionsleiter Dr. Fooke Laboratorien GmbH, Neuss. Seit 2011 Manager Development & Production, BDL Labordiagnostik GmbH, Münster.



Tobias Fischer

Jahrgang 1985. Ausbildung zum Biologisch-technischen Assistenten in Bückeburg. 2006-2008 Produktionsangestellter Downstream-Processing Roche Diagnostics GmbH. 2008-2009 Laborangestellter Trouble Shooting Roche Diagnostics GmbH. Seit 2012 Ökotoxikologiestudium an der FH Münster. 2010-2012 Werkstudent, BDL Labordiagnostik GmbH, Münster.



Dominik Jungen

Jahrgang 1977. Biochemiestudium an der Universität Bochum. 2005 Diplomarbeit in molekularer Onkologie am Zentrum Klinische Forschung (ZKF), Bochum. 2010 Promotion an der Universität Münster. 2010-2012 Postdoc in der AG molekulare Hämatologie/Onkologie am Universitätsklinikum Münster. Seit 2012 Laboratory Manager Research & Development, BDL Labordiagnostik GmbH, Münster.