

Optimization of a mast cell activation assay for rapid and non-invasive allergy diagnosis

Michelle Schranz BMA 23-26

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

1. Zusammenfassung

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde der selbstentwickelte FAST-PASE® (Functional Allergy Screening Test by Passive Sensitization) der Atanis Biotech AG weiterentwickelt und erstmals für die Untersuchung einer Walnussallergie erprobt. Dafür wurden geeignete Testbedingungen und Allergene evaluiert und zwölf Patientenproben mit niedrigen, mittleren und hohen spezifischen IgE Werten (slgE) untersucht.

Der Test umfasst drei Phasen: Zunächst wurden Mastzellen mit IgE sensibilisiert, anschliessend durch das spezifische Allergen aktiviert und die Zellaktivierung mittels Durchflusszytometrie anhand des Oberflächenmarkers CD107a bestimmt. Erste Untersuchungen mit Patientenproben unterschiedlicher slgE-Konzentrationen lieferten vielversprechende Ergebnisse und zeigen das Potenzial von FAST-PASE® als diagnostischen Test. Für eine zukünftige Zulassung ist jedoch eine umfangreiche Validierungsstudie erforderlich.

2. Einleitung

Die Diagnose von Nahrungsmittelallergien basiert auf verschiedenen Verfahren, dazu gehören die Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper, der Haut-Pricktest (SPT), zellbasierte Aktivierungstests und als wichtigstes die orale Nahrungsmittelprovokation. Während spezifisches IgE und der SPT primär eine Sensibilisierung nachweisen, ermöglichen funktionelle Aktivierungstests die Untersuchung einer tatsächlichen IgE-vermittelten zellulären Reaktion. Die Nahrungsmittelprovokation ist ein direkter Beweis für eine Allergie, ist aber mit hohem Aufwand und Kosten, sowie einem hohen Risiko verbunden. [1]

FAST-PASE® basiert auf der Aktivierung von im Labor gezüchteten Mastzellen. Hierfür wird eine Hoxb8-Mastzelllinie verwendet, die den humanen hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI exprimiert. Dadurch können die Zellen mit humanem Serum passiv sensibilisiert und mittels anschliessender Allergenstimulation die IgE-vermittelte Zellaktivierung untersucht werden. [2] Im Vergleich zum Basophilenaktivierungstest (BAT) bietet die Verwendung von Serum oder Plasma eine höhere Probenstabilität, ermöglicht eine langfristige Lagerung und die Detektion sogenannter Basophilen-Non-Responder. [3] FAST-PASE® stellt damit einen vielversprechenden Ansatz für die funktionelle und patientenschonende Allergiediagnostik dar. [3]

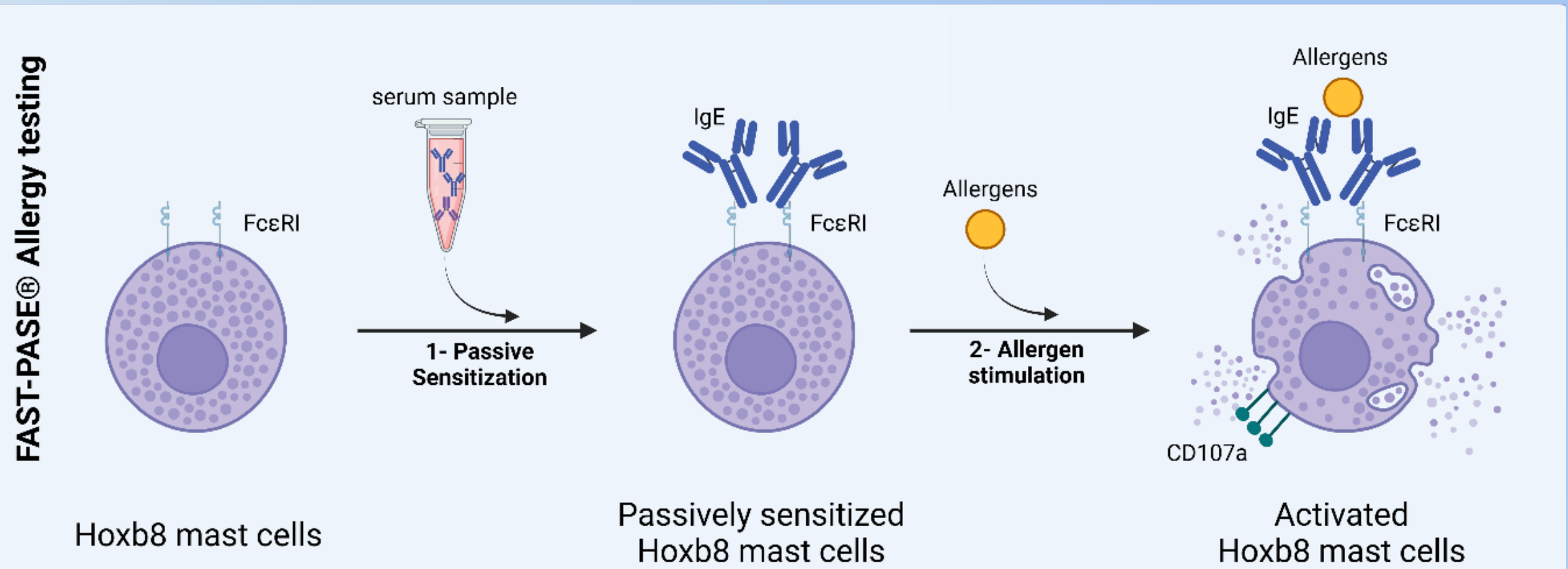


Abb. 1: Veranschaulichung der Aktivierung der Hoxb8 Mastzellen bei einem positiven Resultat.

3. Ziel und Fragestellung

Ziel: Entwicklung des FAST-PASE®-Tests zur Diagnose einer Walnussallergie unter Verwendung eines rekombinanten IgE, getestet mit verschiedenen Walnuss Allergenen sowie Allergen-Konzentrationen zum Nachweis des Walnussallergens mit niedrigen (0,41–0,6 kU/l), mittleren (1,8–4 kU/l) und hohen (>10 kU/l) walnusspezifischen IgE Konzentrationen aus Patientenproben.

Fragestellung: Wie hoch ist die ideale Konzentration vom rekombinanten IgE für die Verwendung als Positivkontrolle zur Sensibilisierung der Hoxb8-Mastzellen im FAST-PASE®-Assay?

Weitere Fragestellungen zum Ziel sind in der Arbeit beschrieben.

4. Material, Methodik, Vorgehen

50'000 differenzierte Hoxb8-Mastzellen wurden pro Vertiefung in einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht mit rekombinantem allergenspezifischem IgE passiv sensibilisiert. Am folgenden Tag wurden die sensibilisierten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Walnussallergens für 25 min bei 37 °C und 5 % CO₂ aktiviert. Gleichzeitig wurde ein fluoresezenzmarkierter Anti-CD107a-Antikörper (LAMP1) zur Detektion der Mastzellaktivierung eingesetzt.

Die Zellaktivierung wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Nach Identifikation der Einzelzellen wurden die Hoxb8-Mastzellen selektiert und anhand der CD107a-Expression in aktivierte und nicht-aktivierte Zellen eingeteilt.

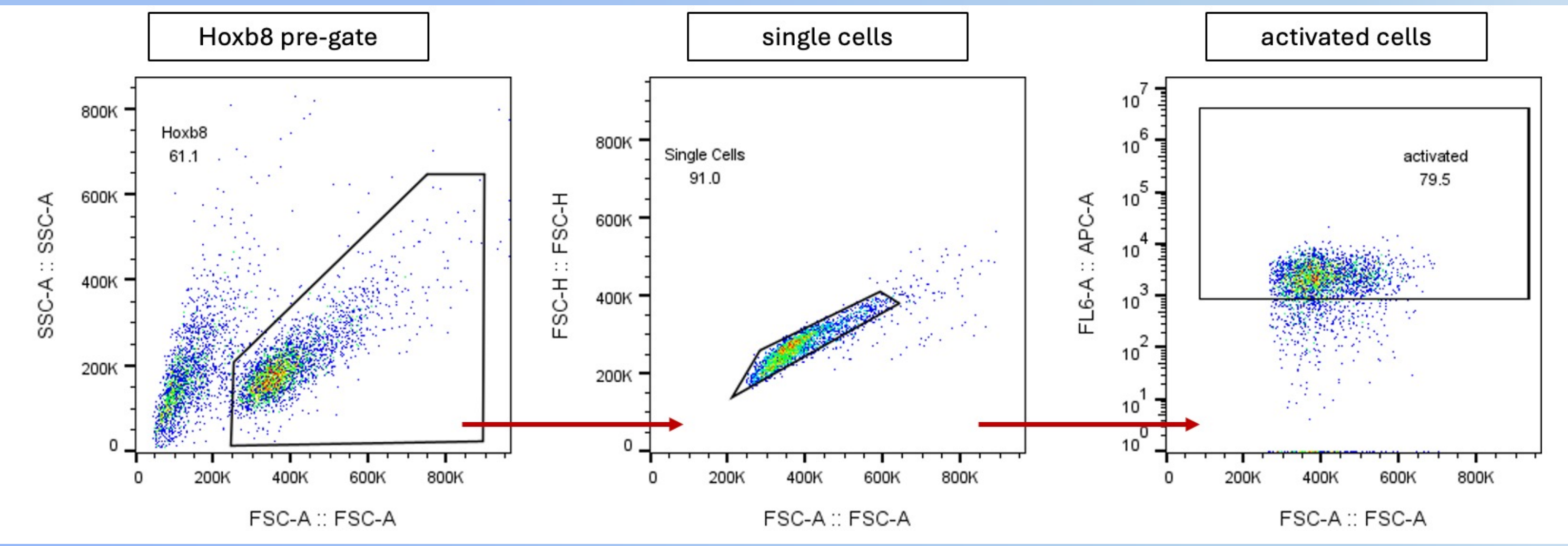


Abb. 1: Gating Darstellung einer positiven Reaktion der Hoxb8 Mastzellen

5. Ergebnisse/ Resultate

Die optimale IgE-Konzentration wurde anhand verschiedener Allergenkonzentrationen und IgE-Konzentrationen untersucht. Die drei durchgeführten Versuche zeigten eine dosisabhängige Aktivierung der Hoxb8-Mastzellen durch das Walnussallergen. Die maximale Aktivierung wurde bei einer bestimmten Allergenkonzentration erreicht, wobei der Aktivierungsgrad mit steigender IgE-Konzentration zunahm.

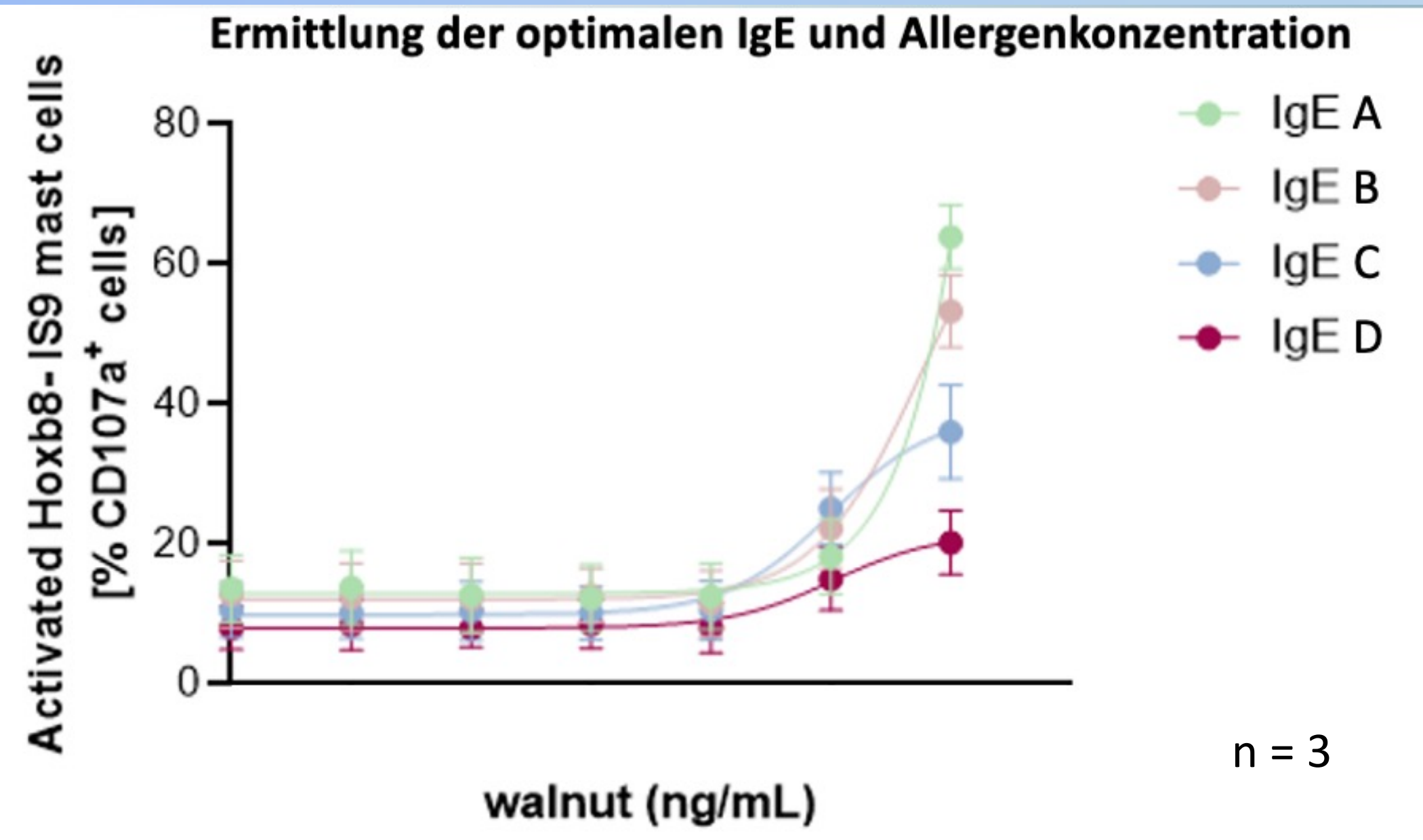


Abb. 3 Aktivierte Hoxb8 Mastzellen mit humanem IgE (A-D) und Walnussallergen.

6. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen eine dosisabhängige Aktivierung der Hoxb8-Mastzellen in Abhängigkeit von der IgE-Konzentration. Die höchste Aktivierung wurde bei IgE A und einer bestimmten Konzentration von Allergen erreicht. Damit konnten geeignete IgE- und Allergenkonzentrationen für die weitere Anwendung des FAST-PASE®-Assays bestimmt werden. Das rekombinante IgE kann zukünftig in der Konzentration A als Positivkontrolle eingesetzt werden. Erste Versuche mit walnuss-spezifischen IgE-positiven und negativen Seren lieferten vielversprechende Ergebnisse. Für eine Zulassung des Tests ist jedoch eine umfassende Validierung erforderlich.

Referenzen

- [1] Worm et al. 2021
- [2] Zbären et al. 2022
- [3] Sonder et al. 2025

Abbildungen

- Abb. 1 Veranschaulichung der Aktivierung der Hoxb8 Mastzellen bei einem positiven Resultat.
- Abb. 2 Gating Darstellung einer positiven Reaktion der Hoxb8 Mastzellen (Schranz, 2026)
- Abb. 3 Aktivierte Hoxb8 Mastzellen mit humanem IgE und Walnussallergen.