

Diplomarbeit

**DIFFERENZIERTE ALLERGIEDIAGNOSTIK MITTELS
REKOMBINANTER ALLERGENE**

Rekombinante Allergene für die Diagnostik

eingereicht von

Martin Semmelrock

Mat.Nr.: 0210042

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dr. W. Aberer

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

Danksagung

Während der Zeit, in der ich mich mit der Erstellung dieser Diplomarbeit befasste, war ich ständig auf Unterstützung von vielen Seiten angewiesen, um diese Aufgabe zu bewältigen. Hiermit möchte ich nun denjenigen Personen danken, mit deren Hilfe ich diese Arbeit zum Ende meines Studiums in der hier vorliegenden Form abschließen konnte:

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. W. Aberer, bei dem ich, auf der Suche nach einem geeigneten Thema für die Verfassung einer Diplomarbeit, fündig wurde. Er stand, während dieser rund 12 Monate, in denen ich mich mit der Durchführung und Auswertung der Studie beschäftigte, immer bei allfälligen Fragen zur Verfügung und gestattete mir, für meine Arbeit zahlreiche Ressourcen der Univ.-Klinik für Dermatologie und Venerologie zu nutzen.

Dem gesamten Team der Ambulanz für Allergologie unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Kränke. Dort wurde ich, über einen Zeitraum von rund 6 Monaten, stets in meinen Bemühungen unterstützt, zahlreiche für diese Arbeit geeignete Patienten zu rekrutieren. Außerdem wurde mir immer ermöglicht, darüber hinaus weitere Einblicke in die Welt der Dermatologie zu gewinnen.

Allen Mitarbeitern/innen des allergologischen Labors der Klinik und der Leiterin Frau M. Herzl, die für mich Blutproben aufbewahrten und auswerteten.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Scharnagl, der mir in Fragen bezüglich der statistischen Auswertung der gesammelten Daten beratend zur Seite stand.

Spezieller Dank gebührt natürlich meiner Familie, die mir das Studium, durch umfassende finanzielle und moralische Unterstützung zu jedem Zeitpunkt meines Lebens, ermöglichte.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	7
2 Abstract.....	9
3 Einleitung.....	10
3.1 Epidemiologische Daten.....	10
3.2 Pathomechanismus der Typ-I-Allergie.....	11
3.3 Eigenschaften der untersuchten Allergene.....	14
3.3.1 Wiesenlieschgras (Phleum pratense).....	14
3.3.2 Birke (Betula verrucosa).....	15
3.3.3 Hauskatze (Felis domestica).....	15
3.4 Die Herstellung rekombinanter Allergene.....	16
3.5 Bisherige Einsatzgebiete für rekombinante Allergene in der Diagnostik.....	17
3.5.1 Erstellung eines individuellen Sensibilisierungsprofils (CRD).....	18
3.5.2 Überprüfung der Indikation für eine Immuntherapie.....	19
3.5.3 Differenzierung zwischen Kreuzallergie und Co-Sensibilisierung.....	21
3.6 Zukunftsperspektive: Component-resolved immunotherapy (CRT).....	23
3.7 Bestehende Limitierungen für die Verwendung rekombinanter Allergene.....	25
3.8 Zielsetzung der Studie.....	26
4 Material und Methoden.....	28
4.1 Studienaufbau.....	28
4.2 Patienten.....	28
4.2.1 Einschlusskriterien.....	28
4.2.2 Ausschlusskriterien.....	29
4.3 Methoden.....	29
4.3.1 Anamnese.....	29
4.3.2 Skin-Prick-Test (SPT).....	30
4.3.3 In-vitro-Testverfahren (Immunoassay).....	31
4.3.3.1 Messung Gesamt-IgE (Phadia ImmunoCAP).....	31
4.3.3.2 Messung allergen-spezifisches IgE (Phadia ImmunoCAP).....	31
5 Ergebnisse.....	33
5.1 Lieschgraspollen-Allergene (Phl p 1, 5b, 7, 12).....	33
5.2 Birkenpollen-Allergene (Bet v 1, 2, 4).....	37

5.3 Katzenhaar-Allergene (Fel d 1)	41
6 Diskussion	43
6.1 Allgemeine Bemerkungen	43
6.2 Auswertung Lieschgraspollen-Allergene	44
6.3 Auswertung Birkenpollen-Allergene	47
6.4 Auswertung Katzenhaar-Allergene	51
7 Abkürzungsverzeichnis	53
8 Literaturverzeichnis	54
9 Abbildungsverzeichnis	59
10 Anhang	61
10.1 Curriculum vitae	61

1 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Derzeit wird die Diagnose einer IgE-vermittelten Allergie durch das Vorliegen einer allergen-spezifischen Anamnese, sowie durch in vivo bzw. in vitro Verfahren unter Verwendung von natürlich vorkommenden Allergenextrakten, gestellt.

Fragestellung: Das Ziel der Studie war ein Vergleich der diagnostischen Ergebnisse, welche bei Patienten mit allergischer Rhinoconjunctivitis auf drei Aeroallergene (Gräser- und Birkenpollen, Katzenepithelien), durch den Einsatz ausgewählter, rekombinanter Allergene und natürlicher Allergenextrakte, im ImmunoCAP (Phadia, Uppsalla, Schweden) erhoben wurden. Vor allem die klinische Relevanz unter Berücksichtigung der aktuellen therapeutischen Möglichkeiten wurde beurteilt.

Methoden: Insgesamt wurde 65 Personen in die Studie aufgenommen. Allergische Patienten waren definiert durch das Vorliegen einer allergen-spezifischen Anamnese und einen entsprechenden positiven Befund im Skin-Prick-Test (SPT) auf natürliche Allergenextrakte. Der IgE-Level wurde anschließend im ImmunoCAP, bei Verwendung von rekombinanten Allergenen und Allergenextrakten, gemessen. Im Rahmen der Studie wurden folgende rekombinante Allergene verwendet: für Gräser Phl p 1, 2, 7 und 12, für die Birke Bet v 1, 2 und 4, für die Katze Fel d 1.

Ergebnisse: Rekombinante Allergen konnten im ImmunoCAP vergleichbare Ergebnisse erzielen wie natürliche Allergenextrakte. Bei Gräser- und Birkenpollen war die Sensitivität der rekombinanten Allergene etwas geringer als die der Extrakte (0,902 zu 0,951) bzw. (0,941 zu 1,000), bei Katzen war die rekombinante Technik sogar leicht überlegen (0,957 zu 0.913).

Diskussion: Bei den untersuchten Allergien konnten, durch eine Auswahl an rekombinanten Allergenen, vergleichbare Ergebnisse erzielt werden, wie in der Extrakt-basierten Diagnostik. Die Sensitivität der neuen Methode bei Katzen ist sogar höher, während sie bei Gräsern und Birken etwas niedriger ist und man für diese beiden Allergenquellen überlegen könnte, weitere Komponente zu integrieren. Aufgrund der verfügbaren therapeutischen Möglichkeiten, sind die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit jedoch klar limitiert. Für die Diagnostik Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

von Kreuzallergien stellt insbesondere die Bestimmung von Bet v 2 und Phl p 12 eine gute Wahl dar.

2 ABSTRACT

Background: Currently, the diagnosis of IgE-mediated allergy is based upon allergen-specific history and diagnostic procedures using natural allergen extracts for in vivo as well as in vitro tests.

Objective: The aim of the study was to compare natural allergen extracts and a mixture of recombinant allergen components for their diagnostic relevance in patients with at least allergic rhinoconjunctivitis to up to three aeroallergens (grass, birch and cat). The results were analysed considering the available therapeutic options.

Methods: 65 allergic Patients were investigated. They were defined as having an allergen-specific history plus an appropriate positive skin-prick test (SPT) to the natural allergen extract. Specific serum IgE-levels were measured with recombinant and natural allergens. The IgE reactivity profiles were determined by a panel of several recombinant allergens: Phl p 1, 5b, 7 and 12 for grass, Bet v 1, 2 and 4 for birch and Fel d 1 for cat.

Results: During the study we observed that recombinant allergens performed almost equally well as natural extracts. In grass (0,902 vs. 0,951) and birch pollen (0,941 vs. 1,000), recombinant allergens were slightly less sensitive compared to conventional CAP, but in cat-allergic subjects sensitivity was even higher than by using natural extracts (0,957 vs. 0,913).

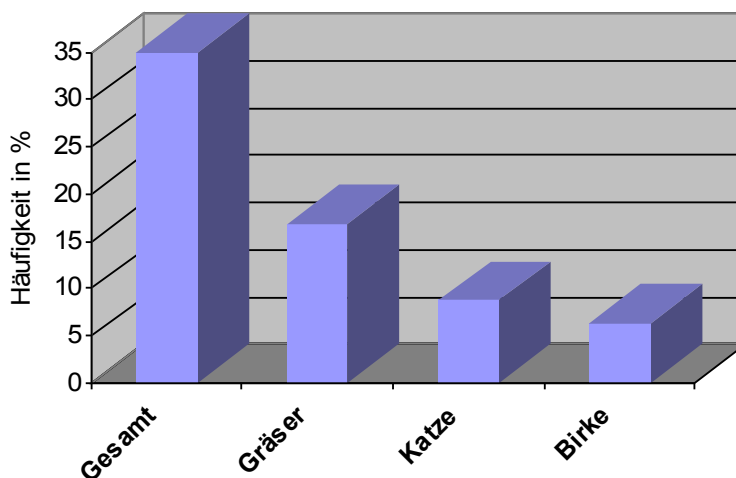
Discussion: Component-resolved testing and CAP based on natural extracts are almost equally relevant in the diagnosis of grass, and birch pollen allergic subjects, while the sensitivity for cat-allergic patients is even higher by using recombinant allergens. Therefore, for a more precise IgE-profile of grass and birch pollen allergic subjects, the addition of further allergens will be required. Regarding the results of the study, there are still major limitations because at the moment adequate therapeutic options are not available. Phl p 12 and Bet v 2 seem to be sufficient for a reliable diagnosis of a cross-reacting allergy.

3 EINLEITUNG

3.1 Epidemiologische Daten

Die Zahl der von einer allergischen Erkrankung betroffenen Personen hat in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen, und mittlerweile sind weltweit bis zu 35 % der Bevölkerung von irgendeiner Allergie betroffen. Daher stellt diese Erkrankungsgruppe die am häufigsten auftretende Immunkrankheit dar. Als hauptverantwortlich für die zunehmende Zahl von allergischen Erkrankungen werden Aeroallergene angesehen, welche saisonal oder perennial auftreten können. Die in dieser Studie untersuchten Allergene zählen zu den weltweit bedeutendsten Auslösern allergischer Reaktionen, man geht davon aus, dass in der Gesamtbevölkerung rund 17 % aller Personen auf Gräserpollen (*Phleum pratense*), 9 % auf Katzenepithelien (*Felis domestica*) und 6 % auf Birkenpollen (*Betula verrucosa*) sensibilisiert sind und auch entsprechende Beschwerden aufweisen (Abb. 3.1). In Nord- und Mitteleuropa ist allerdings eine Sensibilisierung auf Birkenpollen, mit einer regionalen Prävalenz von bis zu 22 %, noch deutlich häufiger als im weltweiten Vergleich (1).

Abbildung 3.1 Prävalenz ausgewählter Sensibilisierungen in der Bevölkerung (1)



3.2 Pathomechanismus der Typ-I-Allergie

Allergische Reaktionen vom Typ I werden ausgelöst durch eine IgE-vermittelte Ausschüttung von Histamin und anderen Mediatorsubstanzen aus Mastzellen und basophilen Granulozyten als Antwort auf den Kontakt mit einer normalerweise für den Körper ungefährlichen Substanz (in der Regel ein Protein).

Zunächst ist hierfür die Sensibilisierung durch das betreffende Allergen notwendig, welches durch Verschlucken, Inhalieren oder Hautkontakt in den Körper aufgenommen wird. Bereits im Epithel erfolgt die Aufnahme durch Dendritische Zellen (insbes. unreife myeloide dendritische Zellen), diese lösen sich aus dem Epithelverband und transportieren das Antigen, unter Einfluss von Interleukin-1 und TNF- α , zu einem örtlichen Lymphknoten, wo es naiven T_{H0}-Zellen via MHC II präsentiert wird. Es folgt, vor allem durch den Einfluss von Interleukin-12, die Prägung dieser undifferenzierten T-Zellen zu allergenspezifischen T_{H2}-Zellen, welche gleichzeitig den CD40-Ligand exprimieren, während die dendritische Zelle durch Apoptose untergeht. Die so geprägten T_{H2}-Zellen verteilen sich anschließend über die Blutbahn im gesamten Körper und spielen durch verschiedene Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Entstehung allergischer Erkrankungen: Sie unterstützen die IgE-Produktion der B-Lymphozyten, locken durch Produktion von Interleukin-5 eosinophile Granulozyten an, stimulieren in Bindegewebszellen die Produktion von Chemokinen und fördern die Expression spezieller Adhäsionsmoleküle in Blutgefäßen.

Für eine Sensibilisierung ist außerdem die Bindung zwischen dem Allergen und dem Antigen-Rezeptor von B-Lymphozyten notwendig, diese internalisieren das Allergen und präsentieren es den mittlerweile geprägten, spezifischen T_{H2}-Zellen via MHC II-Rezeptor und CD40-Ligand. Durch diese Interaktion wird in den T_{H2}-Zellen die Ausschüttung von Interleukin-4 und Interleukin-13 stimuliert, welche die Produktion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern durch B-Lymphozyten anregen, diese werden somit zu IgE-sezernierenden Plasmazellen, welche bei erneutem Allergenkontakt in der Lage sind, große Mengen an IgE zu bilden. Während nur ein geringer Teil von IgE frei im Blut zirkuliert, bindet die Mehrzahl an hochaffine FC ϵ RI-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, außerdem bindet ein Teil der Antikörper auch an eosinophile Granulozyten sowie

antigenpräsentierende Zellen und verstärken dadurch auch die Allergen-Präsentation (2) .

Ausgelöst wird die allergische Reaktion vom Soforttyp durch die Bindung zwischen dem Allergen und mindestens zwei IgE-Molekülen auf Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten. In der Frühphase kommt es danach über mehrere Phosphorylierungsschritte zur Kontraktion von Mikrotubuli und dadurch zur Degranulation, freigesetzt werden dabei präformierte (u.a. Histamin, Tryptase) und neu synthetisierte Mediatoren (u.a. Leukotriene, Prostaglandine, Bradykinin) sowie Zytokine (Interleukine, TNF), die genauen Wirkmechanismen der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Wirkmechanismen der ausgeschütteten Mediatoren im Verlauf einer allergischen Typ-I-Reaktion (3)

Präformierte Mediatoren
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Histamin</i> Kontraktion der glatten Muskulatur im Respirations- und GI-Trakt, Vasodilatation und erhöhte Vasopermeabilität, erhöhte Muzin-Produktion, Pruritus • <i>Tryptase</i> Führt zur mastzellvermittelten Entzündungsreaktion der Haut • <i>Proteoglykane (v.a. Heparin)</i> Hemmung der Blutgerinnung und der Komplement-Aktivität • <i>Chemotaktische Faktoren</i>
Neu gebildete Mediatoren
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Leukotriene</i> B4 – Chemotaxis; erhöhte Gefäßpermeabilität C4, D4, E4 – Bronchokonstriktion, erhöhte Gefäßpermeabilität • <i>COX-Produkte</i> Pg D2 – Bronchokonstriktion, periphere Vasodilatation, zentrale Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregationshemmung, Chemotaxis Pg F2α – Bronchokonstriktion, periphere Vasodilatation, zentrale Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregationshemmung Tx A2 – Vasokonstriktion, fördert Thrombozytenaggregation, Bronchokonstriktion • <i>PAF</i> fördert Thrombozytenaggregation, erhöhte Vasopermeabilität, Bronchokonstriktion, Chemotaxis • <i>Adenosin</i> Bronchokonstriktion

- **Bradykinin**

Vasodilatation und erhöhte Vasopermeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur, Schmerzen

Zytokine

- **Interleukine**

IL 4, IL 13 – stimuliert T_{H2}-Zell-Proliferation und die IgE-Produktion in B-Zellen

IL 5 – Chemotaxis und Aktivierung von Eosinophilen

IL 6 – fördert Muzin-Produktion

- **TNF- α**

Aktivierung neutrophiler Granulozyten

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften der unterschiedlichen Mediatoren kommt es zu den typisch allergischen Symptomen mit Juckreiz, Flush, Ödem, Atemnot bzw. Asthma und gastrointestinalen Beschwerden. Ein Grund für die Ausprägung der allergischen Reaktion ist auch die bevorzugte Lokalisation von Mastzellen in genau dem Gewebe, in welchem besonders häufig Kontakt mit Allergenen besteht: somit v.a. in der Haut, im Respirations- und Gastrointestinal-Trakt. Der wiederholte Kontakt mit dem Allergen kann die Anzahl spezifischer IgE-Antikörper erhöhen, sowie das Fortschreiten der Krankheit und das Auftreten schwerer Symptome fördern (4).

Während in der Frühphase der allergischen Reaktion Mastzellen die tragende Rolle spielen, wird die Spätphase vom Auftreten eosinophiler Granulozyten geprägt, welche durch chemotaktisch wirksame, spezifische Chemokine (v.a. IL-5, Eotaxin, RANTES) angelockt werden. Diese zweite Entzündungsreaktion findet ca. 4 - 8 Stunden nach der ersten Phase statt und dauert bis zu 24 Stunden an, dieser Mechanismus ist bei der Entstehung des makulopapulösen Arzneimittelexanthems beteiligt, aber auch beim allergischen Asthma bronchiale findet man eine Infiltration eosinophiler Granulozyten in der Bronchialschleimhaut. Sie führen zur Freisetzung zytotoxischer Proteine und reaktiver Sauerstoffspezies, welche das Bronchialepithel schädigen (2).

3.3 Eigenschaften der untersuchten Allergene

Inhalationsallergene sind in der Lage, IgE-vermittelte Allergien vom Soforttyp auszulösen, vorausgesetzt ist die Erkennung des Allergens durch das Immunsystem als körperfremd. Für die Auslösung einer Reaktion müssen allergene Substanzen außerdem über mindestens zwei IgE-Epitope verfügen, welche an den FC ϵ -Rezeptor auf Mastzellen oder basophilen Granulozyten binden und eine Quervernetzung ermöglichen.

Mittels DNA-Sequenzierung besteht seit rund zwanzig Jahren die Möglichkeit der Identifikation einzelner Allergenkomponenten aus verschiedenen Allergenquellen (5), die Nomenklatur dieser molekularen Strukturen erfolgt durch die ersten drei Buchstaben der biologischen Art, den ersten Buchstaben der Spezies und die Zahl, in deren Reihenfolge die Identifizierung gelang, z.B.: Bet v 1, Phl p 5, Der f 17 (6). Von besonderer klinischer Bedeutung sind sogenannte Major- oder Hauptallergene, welche dadurch definiert sind, dass bei über 50 % der Patienten, welche auf die entsprechende Allergenquelle sensibilisiert sind, Antikörper dagegen nachweisbar sind (7).

In der folgenden Aufzählung liegt besonderer Augenmerk auf denjenigen Allergenen und Allergenkomponenten, welche von der Fa. PHADIA (Uppsala, Schweden) für den ImmunoCAP1000 derzeit erhältlich sind und daher im Rahmen dieser Studie verwendet werden konnten.

3.3.1 Wiesenlieschgras (*Phleum pratense*)

Wiesenlieschgräser sind windbestäubende Mittelblüher, die vor allem auf Fettwiesen und –weiden bis in ca. 1700 m Seehöhe vorkommen. Aufgrund der weiten Verbreitung ist die Bedeutung in der Allergologie besonders groß. Die stärkste Belastung durch Gräserpollen tritt in den Monaten Mai bis September auf, die Möglichkeit einer Kreuzreaktion besteht zu allen anderen Gräsern, insbesondere Roggen, aber auch Raygras, Knäuelgras, Wiesenrispengras, Hundszahngras und Wiesenschwingel. Weiters treten häufig Kreuzallergien zu Tomaten und Kiwis auf (2).

Es sind mehrere Hauptallergene des Lieschgras bekannt: auf Phl p 1 sind 65 bis 100 % aller Gräserpollenallergiker sensibilisiert, auf Phl p 2 dagegen 10 bis

Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene 13

77 %, wobei die Stärke der IgE-Bindung bei diesem Allergen besonders stark mit den klinischen Symptomen korreliert. Bei 80 bis 88 % der auf Graspollen allergischen Patienten findet man gegen Phl p 4 gerichtete IgE-Antikörper, deren Bedeutung aufgrund der relativ geringen IgE-Konzentration dennoch gering ist, wiederum 45 bis 93 % der Patienten weisen die Bindung mit Phl p 5 auf, außerdem reagieren 34-70 % der untersuchten Sera mit Phl p 6 (8–13).

3.3.2 Birke (*Betula verrucosa*)

Birken sind windbestäubende Frühblüher und unter den Baumpollen die wichtigsten Allergenquellen. Sie kommen in Laub- und Nadelwäldern, Mooren und Heiden bis in etwa 1800 m Höhe vor, die Expositionszeit erstreckt sich etwa von März bis Juni. Die größte allergene Bedeutung haben sie in Mitteleuropa sowie Skandinavien. Häufig liegt gleichzeitig eine Co-Sensibilisierung auf Kräuter- und Gräserpollen vor, außerdem sind zahlreiche Kreuzallergien bekannt, insbesondere gegen andere Baumpollen (Erle, Hasel, Buche, Eiche, Kastanie) aber auch gegen zahlreiche Nahrungsmittel. Zum Beispiel Nüsse, Steinobst, Kiwi und Gemüse können bei Sensibilisierten auf Birkenpollen eine allergische Reaktion hervorrufen (2).

Das Hauptallergen der Birke ist Bet v 1 mit einer IgE-Bindefrequenz von 58 bis 95 % unter den Personen, die gegen Birkenpollen sensibilisiert sind, wobei sogar rund 60 bis 70 % davon ausschließlich auf Bet v 1 sensibilisiert sind (14, 15). Besonders erwähnenswert ist außerdem die nicht-IgE-reaktive Isoform rBet v 1d, welche ein wichtiges Element bei einer möglichen sicheren Immuntherapie für Birkenpollenallergiker darstellen könnte (2). Das Profilin Bet v 2 kennzeichnet eine IgE-Bindefrequenz von 10 bis 45 % (13), und auf Bet v 4 (Ca⁺⁺-bindendes Protein) sind 5 bis 9 % der Birkenpollenallergiker, aber auch 10 bis 15 % der Gräserpollenallergiker sensibilisiert (15, 16). Die beiden letztgenannten Allergene sind hauptverantwortlich für die häufig auftretenden Kreuzallergien.

3.3.3 Hauskatze (*Felis domestica*)

Nach den Milben handelt es sich bei Katzen um die bedeutendste Allergenquelle im häuslichen Bereich, sie bilden außerdem die Gruppe der potentesten tierischen Allergene. Das wichtigste Allergen Fel d 1 wird in der Haut der Katze gebildet, und Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

man weiß, dass durch häufiges Waschen der Katze die Allergenkonzentration verringert werden kann. Als Besonderheit ist Fel d 1 an Schwebepartikel von 5 - 10 µm Durchmesser gebunden und verbleibt daher besonders lange in der Atemluft des Menschen. Kreuzreaktionen zu fast allen Hauskatzen sowie zu Hunden sind bekannt (2).

Als Hauptallergen der Katze gilt nur Fel d 1, auf welches rund 80 % der symptomatischen Patienten IgE-Antikörper bilden (17).

Tabelle 3.2: Übersicht aller, im Rahmen der Studie eingesetzten Allergene (2)

Name	Proteinfunktion	Molekulargewicht (kD)
<i>Lieschgras (Phleum pratense)</i>		
Phl p 1	Protease, Glykoprotein	
Phl p 5b	RNase	32
Phl p 7	Ca ⁺⁺ -bindendes Protein	8,6
Phl p 12	Profilin	14
<i>Birke (Betula verucosa)</i>		
Bet v 1	RNase	17
Bet v 2	Profilin	14
Bet v 4	Ca ⁺⁺ -bindendes Protein	20
<i>Katze (Felis domestica)</i>		
Fel d 1	kollagenolytisch	18

3.4 Die Herstellung rekombinanter Allergene

Zur Herstellung von rekombinanten Allergenen können Gen-Datenbanken unter Zuhilfenahme von IgE-Antikörpern durchsucht werden. Dabei wird zunächst die Messenger RNA (mRNA) einer Allergenquelle durch Einsatz einer reversen Transkriptase in die entsprechende komplementäre DNA (cDNA) überschrieben, diese wird dann in eine geeignete Phagen-DNA ligiert. Weiters werden Bakterien (insbes. E.coli) mit diesen Phagen infiziert, wodurch das jeweilige Allergen von den Bakterien exprimiert wird und mit Hilfe der IgE-Antikörper aus dem Serum von allergischen Patienten lokalisierbar ist. Die Bakterien-Klone werden durch mehrmaliges Durchführen dieses Screenings gereinigt, schließlich kann die für

das Allergen codierende cDNA in ein passendes Expressionssystem transportiert werden. Die gereinigten rekombinanten Allergene werden durch folgende Untersuchungen auf ihre biologische Aktivität geprüft: IgE-Bindung, Stimulation spezifischer T-Zellen, Basophilen-Aktivierungs-Test, Induktion der IgE-Produktion in Tiermodellen, Provokationstestungen an Menschen.

Nun besteht die Möglichkeit rekombinante Allergene mit exakt denselben genetischen und biologischen Eigenschaften, in stets gleich bleibender Qualität, zu produzieren (5, 14). Im Gegensatz zur Herstellung von Extrakten ist eine Quantifizierung der enthaltenen Protein-Menge und auch der IgE-Reaktivität möglich (18).

3.5 Bisherige Einsatzgebiete für rekombinante Allergene in der Diagnostik

Durch die raschen Fortschritte der Molekularbiologie innerhalb der vergangenen Jahrzehnte gelang es im Jahr 1988 mit Der p 1 das erste Allergen zu klonen (19), viele weitere wurden daraufhin entdeckt und produzierbar. Mittlerweile kann man für zahlreiche allergene Substanzen individuelle Sensibilisierungsmuster erstellen, welche die wichtigsten Allergene enthalten. Ein wesentlicher Vorteil ist die Tatsache, dass im Gegensatz zu gereinigten Allergenextrakten, die sowohl allergenes als auch nicht-allergenes Material enthalten können, durch die Verwendung von rekombinant hergestellten Allergenen eine wesentlich genauere Definition der Inhaltsstoffe ermöglicht wird. Insbesondere kann die Verunreinigung durch andere nicht-verwandte Allergene verhindert werden, welche im Test zu falsch-positiven Resultaten führen könnten (20). Hinzu kommt, dass der Allergengehalt in natürlichen Extrakten je nach Hersteller sowie Aufbereitungsweise variieren kann und wichtige Allergene eventuell fehlen, die noch immer am häufigsten verwendeten Extrakte sind bis heute nämlich nur schwierig zu standardisieren (9, 21). Das folgende Kapitel soll die bisherigen Entwicklungen auf diesem Gebiet in einem kurzen Überblick zusammenfassen, um schließlich den aktuellen Wissensstand zu erläutern.

3.5.1 Erstellung eines individuellen Sensibilisierungsprofils (CRD)

Ziel bei der Verwendung von rekombinanten Allergenen in der Allergie-Diagnostik ist die Erstellung eines individuellen Sensibilisierungsprofils für jede Person, da für die extrakt-basierte Allergiediagnostik als größter Nachteil gilt, dass die Bestimmung des krankheitsauslösenden Allergens nicht genau möglich ist. Die bisherigen Ergebnisse von Untersuchungen auf diesem Gebiet sind recht vielversprechend und werden im folgenden Abschnitt zusammengefasst.

Zahlreiche im Lieschgras enthaltene Allergene sind mittlerweile bekannt, man konnte jedoch feststellen, dass die Verwendung einiger weniger, häufig vorkommender Allergene den Nachweis einer Gräserpollen-Allergie in fast allen Fällen ermöglicht. So erlaubte der Einsatz von rekombinant hergestelltem Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5 und dem Birkenprofilin Bet v 2 die in-vitro Diagnose einer Gräserpollen-Allergie bei 94,5 % der getesteten Personen in verschiedenen Populationen. Die Sensibilisierungsraten sind dabei regional unterschiedlich und reichen für Phl p 1 von 65 bis 100 %, für Phl p 2 von 10 bis 77 %, für Phl p 5 von 45 bis 93 % und für das Birkenprofilin Bet v 2 von 5 bis 15 %. Für die hohe Genauigkeit der Testung, unter Verwendung rekombinanter Allergene, spricht außerdem die Tatsache, dass bei allen negativ getesteten Personen der Gehalt an Lieschgras-spezifischen IgE-Antikörpern sehr niedrig (< 3.89 kU/l) war (8). Weitere Studien konnten unter Einsatz dieser drei häufigsten Allergene Phl p 1, 2 und 5 mit ähnlich guten Ergebnissen (bis zu 99 % Erfolgsquote) zeigen, dass in nahezu allen Fällen eine korrekte Diagnose zu stellen ist, sofern der spezifische IgE-Wert auf das Allergenextrakt nicht auch extrem niedrig ist (9, 10). Verwendet man eine etwas größere Mischung aus rekombinant hergestellten Allergenen (Phl p 1, 2, 4, 7, 11, 12) können bereits 99 % aller Gräserpollen-Allergiker erfolgreich diagnostiziert werden (20).

Für die Testung von Birkenpollenallergikern stehen deutlich weniger Allergene zur Verfügung, die wichtigsten dabei sind Bet v 1, 2 und 4. Eine Kombination dieser drei Allergene erlaubt die korrekte Diagnosefindung von rund 89 % aller von einer Birkenpollenallergie betroffenen Personen. Um eine noch präzisere Diagnosefindung zu ermöglichen, bei welcher auch die fehlenden rund 10 % der allergischen Patienten erfasst werden können, wäre die Einbindung von weiteren rekombinanten Allergenen (z.B. Bet v 3, 6, 7, 8) nötig (15).

3.5.2 Überprüfung der Indikation für eine Immuntherapie

Die spezifische Immuntherapie, durch Verabreichung steigender Mengen eines Allergens, ist derzeit die einzige Möglichkeit, eine bestehende Typ-I-Allergie kausal zu therapieren. Die Zuverlässigkeit dieser Therapiemöglichkeit ist zwar je nach vorliegender Allergie und Schweregrad unterschiedlich, jedoch hat sie sich insgesamt als klinisch effiziente Behandlung bewährt. Die besten Ergebnisse durch Einsatz einer Immuntherapie werden demnach erzielt bei Patienten, die auf nur ein einziges Allergen sensibilisiert sind, und bereits an rhinokonjunktivalen Beschwerden, aber noch nicht an allergischem Asthma, leiden (22–24).

Da zur Impfung wiederum Extrakte aus einzelnen Allergenquellen verwendet werden, deren exakte Inhaltsstoffe, wie bereits erwähnt, aufgrund mangelnder Möglichkeit der Standardisierung nicht eindeutig bekannt sind, geht man davon aus, dass in den zur Impfung eingesetzten Extrakten wenigstens die wichtigen Hauptallergene vorhanden sind, gegen welche auch die Mehrheit der jeweiligen Allergiker Antikörper bildet. Über den Gehalt an zusätzlich vorhandenen Nebenallergenen, wie auch weiterer allergener und nicht-allergener Moleküle, herrscht weitgehend Unklarheit, man muss jedoch annehmen, dass je nach Hersteller und Herstellungsmethode unterschiedliche Allergen-Kombinationen in den jeweiligen Impfextrakten vorhanden sind (17, 24–26). Auch bezüglich des Gehalts an Profilin sind die meisten Allergenextrakte für die Immuntherapie nicht standardisiert, weshalb ausschließlich darauf sensibilisierte Patienten von einer Therapie vermutlich nicht profitieren würden (15). Bei Patienten ohne bisherige Profilin-Sensibilisierung könnte es dagegen sogar zu einer Erweiterung des Allergiespektrums kommen. Ähnliches wie für Profileine gilt auch für die ebenfalls kreuzreaktiven Ca^{++} -bindenden Proteine, da die meisten Allergenextrakte auch auf diese Bestandteile nicht standardisiert sind (14, 27).

Ein besonders gutes Ansprechen auf die Immuntherapie mit Birkenpollenextrakten scheinen etwa Allergiker mit der Sensibilisierung auf Bet v 1 zu zeigen, da die meisten verfügbaren Birkenpollen-Extrakte auf Bet v 1 standardisiert sind, und dieses daher in ausreichender Menge enthalten, für die Allergene Bet v 2 und Bet v 4 ist das allerdings nicht der Fall (14, 25). Unter Patienten mit positiven ImmunoCAP-Resultaten auf Birkenextrakte konnte jedoch

in immerhin bis zu 42 % der Fälle keine Reaktion auf das wichtigste Allergen Bet v 1 nachgewiesen werden, und da es in diesem Kollektiv sogar wahrscheinlicher ist, dass die ursprüngliche Sensibilisierung durch eine nicht-verwandte Allergenquelle hervorgerufen wurde (25), wird eine extrakt-basierte Immuntherapie nach heutigem Stand nicht empfohlen (15). In diesem Fall, wie auch bei Vorliegen einer Polysensibilisierung, sollte bevorzugt eine symptomatische Therapie durchgeführt werden (25).

Als Hauptallergene des Lieschgrases, welche sich wohl auch in allen (subcutan zu applizierenden) Immuntherapie-Extrakten befinden, gelten Phl p 1, 2 und 5, daher wird angenommen, dass bei Sensibilisierten auf diese Allergene eine Immuntherapie den größten Erfolg bringt, während bei einer ausschließlichen Sensibilisierung etwa auf das Profilin Phl p 12, eine Immuntherapie wenig Sinn machen dürfte, da auf dieses die meisten Impfextrakte nicht standardisiert sind (14). Außerdem werden bei Graspollenallergikern die Allergengruppen 1, 2, 5 und 6 als Kennzeichen für eine genuine Sensibilisierung auf Graspollen gesehen, da diese ausschließlich in Pollen von Grassorten vorkommen, der Einsatz einer Component-resolved-diagnostic (CRD) könnte jedoch darauf hinweisen, welche der Grasarten für die Allergie verantwortlich ist. Im Gegensatz zu den Graspollenallergenen der Gruppen 1, 2 und 5, welche in den meisten Gräsern nachweisbar sind, kommen Gruppe 6 Allergene nur in wenigen Gräsern vor (u.a. Lieschgras, Wiesenrispengras). Das Vorhandensein dieser gibt also konkrete Hinweise darauf, gegen welche Grasart der Patient sensibilisiert ist (14).

Dementsprechend könnte ein vorliegendes Sensibilisierungsprofil, nach dem derzeitigen Wissensstand, für jeden einzelnen Patienten von Vorteil sein, der aufgrund der ausgeprägten Beschwerden für eine Immuntherapie infrage kommt. Erfahrungsgemäß zeigt sich bei einem vergleichsweise kleinen Patientenkollektiv, dass, nach konventionellen Methoden als eindeutig allergisch befundene Personen, in der differenzierten Betrachtung und unter Verwendung rekombinanter Allergene, Sensibilisierungsmuster aufweisen können, nach welchen ausschließlich IgE-Antikörper gegen die seltener vorkommenden Minor-Allergene im Serum nachweisbar und daher für das Entstehen der Allergie verantwortlich sind. Auch wenn die Möglichkeit der Neusensibilisierung unter laufender Immuntherapie umstritten ist, gibt es Anhaltspunkte, dass die Durchführung einer

SIT kein Risikofaktor für das Auftreten von Neusensibilisierungen bei zuvor monosensibilisierten Patienten ist (28), bzw. dadurch die Wahrscheinlichkeit einer IgE-Neubildung sogar signifikant reduziert werden kann (23, 29). Eine mögliche Neubildung von allergieverursachenden Antikörpern gegen Bestandteile des Impfextraktes ist jedoch ebenfalls nicht auszuschließen, daher könnte man nach dem Erstellen des individuellen Sensibilisierungsprofils bei Patienten, welche keine Antikörper gegen Hauptallergene aufweisen, vermutlich von einer Immuntherapie Abstand nehmen, da aufgrund höchstwahrscheinlich fehlender Allergene im Extrakt keine Besserung der bestehenden Symptome zu erwarten ist, während durch die Applikation von Hauptallergenen, gegen welche zuvor keine Immunisierung bestand, die Gefahr besteht, neue Sensibilisierungen hervorzurufen.

3.5.3 Differenzierung zwischen Kreuzallergie und Co-Sensibilisierung

Unterschiedliche Allergenquellen können ähnlich aufgebaute kreuzreaktive Strukturen beinhalten. Diese führen dazu, dass eigentlich monosensibilisierte Allergiker auch beim Kontakt mit diesen kreuzreaktiven Allergenen anderer Quellen an Symptomen leiden können. Durch den Einsatz von rekombinanten Allergenen konnte man das Vorliegen immunologisch ähnlicher Moleküle in unterschiedlichen Allergenquellen nachweisen (30).

Besondere Bedeutung bei der Entstehung von Kreuzallergien kommt den so genannten Profilinen zu. Diese Proteine sind als Teil des Zytoskeletts in zahlreichen nicht verwandten Pflanzen, aber auch als Autoallergene in menschlichen Zellen vorhanden. Ein Profilin-sensibilisierter Patient kann daher klinisch als polysensibilisierter Allergiker imponieren. So weisen 30 % aller Lieschgraspollen-Allergiker eine Sensibilisierung gegen das Gras-Profilin Phl p 12 auf, insbesondere konnte man im Immunoblot aber bei allen Personen auch eine vergleichbare Reaktivität auf das rekombinante Birken-Profilin Bet v 2 nachweisen, was für das Vorliegen einer Kreuzallergie spricht (31). Dementsprechend wurden hoch-positive Korrelationen zwischen den spezifischen IgE-Antikörper-Werten gegen die Profileine Bet v 2 und Phl p 12 beobachtet (11).

Bei den ebenfalls kreuzreaktiven Ca^{++} -bindenden Proteinen mit zwei Bindungsstellen für Kalzium, auf welche 5 – 10 % der Pollenallergiker sensibilisiert sind (32), verhält es sich ähnlich wie bei den Profilinen: Sie kommen ebenfalls in verschiedensten, nicht-verwandten Pflanzen vor, jedoch nur in Pollen und nicht in anderen Bestandteilen der jeweiligen Pflanzen, sie können daher als Marker für multiple Pollensensibilisierungen dienen (32). So wurde beispielsweise eine starke Korrelation zwischen dem Auftreten des Ca^{++} -bindenden Birkenproteins Bet v 4 und dem entsprechenden Lieschgras-Allergen Phl p 7 beobachtet (11). Ein Patient, der auf ein bestimmtes Kalzium-bindendes Protein (z.B. Phl p 7) sensibilisiert ist, wird daher in einem Test, unter Verwendung von Allergenextrakten, mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls positive Resultate auf Pollen anderer Gräser, Bäume und Unkräuter zeigen (14). Bei Untersuchungen an Patienten, welche IgE-Reaktivität auf zumindest eines der Ca^{++} -bindenden Allergene aufweisen, konnte in bis zu 100 % eine Sensibilisierung auf mehrere nicht verwandte Pollen beobachtet werden (32).

Unter Birkenpollenallergikern werden besonders gehäuft gleichzeitig Unverträglichkeiten von einigen Obst- und Gemüsesorten (u.a. Apfel, Sellerie, Karotte) beobachtet. Interessanterweise findet man bei Personen, deren Serum im Immunoassay IgE-Antikörper auf Bet v 1 (17 kd) und/oder das Birkenprofilin Bet v 2 (14 kd) aufweist, beim Test auf die jeweiligen Nahrungsmittelextrakte Antikörperbanden in nahezu demselben Bereich(33). Zeigt ein Birkenpollenallergiker hingegen gar keine Reaktion auf Bet v 1, so ist eine initiale Sensibilisierung mit Birkenpollen sogar recht unwahrscheinlich. Der positiven Reaktion auf das Birkenpollenextrakt dürfte, bei einer derartigen Konstellation, in den meisten Fällen eine Sensibilisierung gegen ein Profilin oder ein Kalzium-bindendes Protein zugrunde liegen. Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, dürfte die Immuntherapie mit einem Birkenpollenextrakt in diesem Fall wenig erfolgreich sein und wird aus diesem Grund nicht empfohlen (14).

Als therapeutische Konsequenz, kann das Vorhandensein von IgE-Antikörpern gegen bestimmte kreuzreaktive Komponente dazu führen, dass prophylaktische Maßnahmen ergriffen werden können, indem etwa die in Frage kommenden Nahrungsmittel gemieden werden (34).

3.6 Zukunftsperspektive: Component-resolved immunotherapy (CRT)

In der Diagnostik eingesetzt, ermöglichen rekombinant produzierte Allergene die Erstellung eines individuellen IgE-Sensibilisierungs-Profiles für jeden einzelnen Patienten (12). Geht man von der Verfügbarkeit rekombinanter Allergene im Rahmen der Immuntherapie aus, wäre es möglich, Patienten mit einem Allergen-Mix, gemäß des zuvor bestimmten Profils, zu behandeln, nicht wie bisher mit einem gereinigten Extrakt der Allergenquelle (20). Bei Anwendung einer CRT wäre es möglich, die benötigten Allergene in beliebiger Zusammensetzung zu integrieren und alle unerwünschten Zusätze auszuschließen, wodurch eine ständig gleich bleibende Qualität der Impfstoffe gesichert wäre (7, 27).

Hinzu kommt, dass der Einsatz von rekombinanter DNA-Technologie die Herstellung von einzelnen hypoallergenen Derivaten, mit verminderter IgE-Reaktivität aber gleichzeitig erhaltener therapeutischer Wirkung, erlaubt. Unveränderte rekombinante Allergene können, aufgrund ihrer hohen Reinheit, sogar in niedrigen Dosierungen zu anaphylaktischen Reaktionen führen (24). Mit einer somit künstlich herbeigeführten, verminderten IgE-Reaktivität kann das Auftreten von Nebenwirkungen noch weiter vermindert werden. Im besten Fall könnten, bei geringerem Risiko für unerwünschte Wirkungen, sogar höhere Allergen-Dosen in der Therapie zur Anwendung kommen (7, 9, 12, 20). Lediglich Allergene mit natürlich vorkommend niedriger IgE-Reaktivität kämen, in unveränderter Form, für die Verwendung in Impfstoffen in Frage, als einzige geeignete Form für therapeutische Zwecke ist bislang nur Bet v 1 bekannt (24).

Bei einer Immuntherapie, die an Birkenpollenallergikern durchgeführt wurde, konnte bei Patienten, gegen welche vor Einleitung der Therapie ausschließlich Antikörper auf Bet v 1 nachweisbar waren, im Verlauf der Behandlung mit den derzeit üblicherweise verwendeten Extrakten jedenfalls in einigen Fällen (bei 29 % der untersuchten Patienten) das Neuauftreten von IgE-Antikörpern gegen Bet v 2 und/oder Bet v 4 festgestellt werden. Die Mehrzahl dieser Neusensibilisierungen auf Nebenallergene trat nach dem ersten Jahr der Immuntherapie auf. Dieses Problem, welches durch die Verwendung von nicht-standardisierten Extrakten mit

teilweise unbekanntem Inhalt besteht, könnte durch die Entwicklung einer maßgeschneiderten Immuntherapie beseitigt werden (16). Weiters wurde nachgewiesen, dass im Laufe einer Immuntherapie nicht nur ein (erwünschter) Anstieg der allergen-spezifischen IgG-Untergruppen vorkommt, sondern auch der IgE-Level teilweise zunimmt. Es kann bis zum Neuauftreten von zuvor nicht messbaren spezifischen Antikörpern kommen (35).

In einer ersten Studie wurde an 62 Patienten die subkutane Immuntherapie mit einem ausgewogenen Mix der fünf wichtigsten Lieschgraspollen-Allergene erprobt: Phl p 1, 2, 5a/5b und 6. Dabei konnte ein hoch signifikanter Anstieg der spezifischen Antikörper IgG₁ sowie IgG₄ beobachtet werden, welche die normale Immunantwort beweisen. Auffallend und, sofern die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse gelingt, von Bedeutung, ist die Tatsache, dass bei der geringen Anzahl an Patienten, die vor Beginn der Studie keine Antikörper gegen Phl p 5a/5b hatten, auch durch die Immuntherapie keine Neubildung von IgE-Antikörper auftrat, währenddessen die Bildung von IgG₁ und teilweise auch IgG₄ gegen eben diese Allergene erfolgte. Obwohl der Großteil aller Graspollen-Allergiker von der erprobten Kombination an Allergenen profitieren würden, sollten weitere Untersuchungen zeigen, ob für einige Patienten der Zusatz anderer Allergene sinnvoll wäre, um die am häufigsten auftretenden Sensibilisierungsmuster behandelnd zu können (36).

Ebenfalls wurde bereits ein Therapieversuch mit rekombinant hergestelltem Bet v 1 mit > 100-fach verringerter allergener Aktivität unternommen, hierbei kam es bei geimpften Birkenpollenallergikern nach Beginn der Immuntherapie zu einem starken Anstieg der allergenspezifischen IgG-Antikörper (v.a. IgG₁, IgG₂ und IgG₄). Ebenfalls konnte ein leichter Anstieg der Antikörper-Spiegel von IgA und IgM gemessen werden, während insgesamt keine Reaktion auf andere Allergene als eben Bet v 1 auftrat. Nach der Therapie kam es während der Birkenpollensaison zu einem deutlich geringeren IgE-Anstieg. Im Vergleich zu vorhergehenden Beobachtungen bei der Extrakt-basierten Immuntherapie ergeben sich daraus zwei Vorteile: Da die Bestandteile der Extrakte nicht sicher bekannt sind, kann es vorkommen, dass gegen für den Patienten wichtige Allergene keine Antikörper gebildet werden, außerdem ist bei der Verwendung von Extrakten zur Therapie eine unerwünschte IgE-Antwort auf eine neue Allergenkomponente möglich (37).

Trotz der ersten, bislang erreichten Ergebnisse, die für den zukünftigen Einsatz einer maßgeschneiderten Immuntherapie sprechen, dürfte wohl noch einige Zeit vergehen, bis dieses Konzept (wenn überhaupt möglich) auf breiter Basis umsetzbar sein wird. Voraussetzung dafür ist der Beweis einer klinischen Wirksamkeit, um die CRT, auch im Vergleich mit aktuell verwendeten Methoden, zu gerechtfertigen, was aber bisher noch nicht in ausreichender Form gelang.

In näherer Zukunft könnten einige, häufig verwendbare Standardkombinationen von wichtigen, rekombinanten Allergenen in Form einer Impfung verfügbar sein. In bestimmten Fällen könnten auch Einzelallergene eine Therapieoption darstellen, was besonders gut für Katzen- (Fel d 1) und Birkenpollenallergien (Bet v 1) vorstellbar wäre. Für die Herstellung eines Impfstoffes gegen die Gräserpollenallergie gilt wiederum, dass der Versuch, sämtliche bedeutende Allergene zu inkludieren, nur schwer bis gar nicht umsetzbar sein wird, viel mehr scheint es realistisch und sinnvoll, eine Auswahl der wichtigsten Allergene, beispielsweise bestehend aus Phl p 1, 2, 5 und 6 einzuschließen (12).

3.7 Bestehende Limitierungen für die Verwendung rekombinanter Allergene

Die Entwicklung der letzten Jahre erlaubt mittlerweile erfolgreich die Diagnose von Sensibilisierungen gegen zahlreiche Allergene und stellt einen klaren Fortschritt im Vergleich zum Einsatz von Allergenextrakten in der Routineabklärung dar. Wie zuvor beschrieben, ist die Erstellung eines patienten-individuellen Sensibilisierungsmusters möglich, Kreuzallergien können besser damit von echten Polysensibilisierungen unterschieden werden. Von besonderer Bedeutung ist jedoch die Fragestellung, ob im Einzelfall die Indikation für die Durchführung einer Immuntherapie gegeben ist. In diesem Punkt gibt es insofern eine beträchtliche Einschränkung, als die genaue Zusammensetzung hinsichtlich des Allergengehalts der Impfextrakte unterschiedlicher Produzenten nicht im Allgemeinen bekannt gegeben wird, bzw. aufgrund des Herstellungsverfahrens wohl nicht im Detail bekannt sein dürfte. Dadurch kann es, je nach Hersteller, zu Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

beträchtlichen Unterschieden in der Zusammensetzung von am Markt erhältlichen Extrakten kommen (17, 26).

Im Einzelfall basieren darum alle Überlegungen, welche sich aus dem Ergebnis der Component-resolved-diagnosis ergeben, und aufgrund des bestimmten Allergenprofils für oder gegen eine Immuntherapie sprechen, auf der nicht eindeutig gesicherten Annahme, dass in den für die Impfung verwendeten Extrakten die benötigten Neben-Allergene, im Gegensatz zu Hauptallergenen, nicht in ausreichender Menge enthalten sind und bei gewissen Allergen-Konstellationen somit ein therapeutischer Effekt nicht zu erwarten ist. Solange die vorhin erwähnte Component-resolved-therapy nicht erhältlich ist, besteht daher gerade diese eine, wesentliche Limitierung für die Verwendung rekombinanter Allergene in der Routinediagnostik, gleichzeitig ist die möglichst rasche weitere Entwicklung auf diesem Gebiet natürlich anstrebenswert.

3.8 Zielsetzung der Studie

Die allergen-spezifische Immuntherapie stellt derzeit den einzigen kurativen Ansatz in der Behandlung Typ-I-allergischer Erkrankungen dar. Es werden dabei jedoch Allergenextrakte eingesetzt, deren Zusammensetzung abhängig von der Herstellungsweise variieren kann. Durch die Entwicklung rekombinanter Allergene besteht vielleicht zukünftig die Möglichkeit einer patienten-orientierten Therapie, indem nur mit exakt den Allergenen behandelt wird, gegen welche der jeweilige Patient sensibilisiert ist. Allerdings hat sich die Verwendung rekombinanter Allergene in der Immuntherapie aus verschiedenen Gründen bisher noch nicht im klinischen Routinebetrieb durchgesetzt.

In dieser Studie soll nun untersucht werden, ob der Einsatz rekombinanter Allergene und die Erstellung eines individuellen Sensibilisierungs-Profiles eine differenziertere Diagnostik als mit den gegenwärtig verwendeten diagnostischen Mitteln ermöglicht und ob sich daraus Konsequenzen für das weitere therapeutische Prozedere ergeben.

In dieser Arbeit wird evaluiert, ob im getesteten Kollektiv bei Patienten Sensibilisierungsmuster nachgewiesen werden können, welche nach dem

derzeitigen Wissensstand für oder gegen die Behandlung in Form einer Immuntherapie sprechen. Da man davon ausgehen kann, dass die in der Immuntherapie verwendeten Extrakte hinsichtlich ihres Gehaltes an Hauptallergenen einigermaßen standardisiert sind, wäre gerade das Auftreten von Sensibilisierungsmustern, in denen diese Hauptallergene fehlen, von besonderer Bedeutung, da in einem solchen Fall von einer Impfung Abstand genommen werden kann. Denn Nebenallergene wie zum Beispiel die stark kreuzreaktiven Profiline, sind in den Impfstoffen nicht konstant vorhanden, währenddessen die Gefahr einer Neusensibilisierung gegen die verabreichten Hauptallergene besteht. Durch die Möglichkeit allergene Bestandteile einer Impfung, gemäß dem individuellen Sensibilisierungsprofil, frei zu kombinieren, wäre zukünftig vielleicht eine maßgeschneiderte Immuntherapie für jeden Patienten möglich.

Weiters ist durch die Identifikation der einzelnen Allergenbestandteile, der Nachweis einer Sensibilisierung auf die stark kreuzreaktiven Profiline oder Ca^{++} -bindenden Proteine möglich, die Aufschluss darüber geben, ob eine echte Polysensibilisierung auf mehrere Allergenquellen vorliegt, oder ob durch die Reaktion auf diese speziellen Moleküle eine solche nur vorgetäuscht wird, indem Kreuzreaktionen auch bei nicht verwandten Spezies ausgelöst werden. Entsprechend der Ergebnisse könnte man eventuell prophylaktische Maßnahmen ergreifen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Studienaufbau

Die Studie wurde im Zeitraum von April bis November 2008 an insgesamt 65 Patienten mit zumindest einer symptomatischen, inhalativen Typ-I-Allergie durchgeführt, darunter waren 41 Personen auf Gräser sensibilisiert, 34 auf Birken und weitere 23 auf Katzenepithelien, ebenfalls möglich waren Mehrfachsensibilisierungen auf die untersuchten Allergene. Die Patienten litten zumindest an rhinoconjunctivalen Beschwerden, eventuell auch an allergischem Asthma bronchiale, im für das jeweilige Allergen typischen Zeitraum.

Die Einnahme von Antihistaminika oder Kortikosteroiden musste für eine Woche vor der Untersuchung pausiert werden. Der Skin-Prick-Test unter Verwendung von Allergenextrakten wurde an den Unterarmen der Patienten durchgeführt, die Ablesung erfolgte nach 20 Minuten Einwirkzeit. Im Anschluss wurde zur weiteren Untersuchung eine venöse Blutabnahme durchgeführt (in einem Serumröhrchen) und nach Bestimmung der gesamten und spezifischen IgE-Antikörper das verbleibende Patientenserum bei -20°C in zwei Portionen eingefroren.

4.2 Patienten

Als Probanden für die Teilnahme an der Studie infrage kamen alle Patienten, die zwischen April und Dezember 2008 die Allergologische Ambulanz der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie besuchten.

4.2.1 Einschlusskriterien

Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war das Vorliegen einer Sensibilisierung auf Gräser- oder Birkenpollen bzw. auf Katzenhaare, wobei mindestens eine, aber auch mehrere der genannten Allergien vorliegen dürfen. Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

Aufgenommen wurden solche Patienten, bei denen aufgrund der eindeutig ausgeprägten Symptome eine Immuntherapie theoretisch in Frage käme, die Diagnose, welche zur Teilnahme an der Studie berechnigte, musste durch positive klinische Zeichen, sowie das Auftreten einer urtikariellen Hautreaktion im Pricktest bestätigt werden.

4.2.2 Ausschlusskriterien

Patienten mit positivem Pricktest und/oder positivem Immunoassay bei eindeutig negativer Anamnese wurden aufgrund der fraglichen Spezifität der genannten Untersuchungsmethoden nicht in die Studie aufgenommen, ein weiteres Ausschlusskriterium war eine bereits eingeleitete Immuntherapie gegen die untersuchten Allergene, sowie das Vorliegen einer Schwangerschaft.

4.3 Methoden

4.3.1 Anamnese

Durch eine Befragung der Patienten mittels ausführlichen Anamnesebogens besteht die Möglichkeit, einen gezielten Verdacht auf das Vorliegen einer Allergie zu äußern, welche durch den Skin-Prick-Test bzw. die serologische Bestimmung spezifischer Antikörper bestätigt werden muss. Patienten mit negativer Anamnese trotz eventuell vorliegender Sensibilisierung aufgrund der Ergebnisse aus den weiterführenden Tests kamen nicht als Probanden in Frage, da beschwerdefreie Personen im Regelbetrieb auch nicht in das Patientenkollektiv fallen und für eine Immuntherapie ebenso nicht in Frage kommen.

Wesentliche Informationen, um den Verdacht auf das Vorliegen einer Allergie zu erhärten, beinhalten das zeitliche und örtliche Auftreten der Symptome. Aber auch die Frage nach Unverträglichkeiten von ausgewählten Nahrungsmitteln kann wegen der häufig zu beobachtenden Kreuzreaktionen diese Vermutung bestätigen.

4.3.2 Skin-Prick-Test (SPT)

Bei der Durchführung eines Pricktests wird eine geringe Menge eines allergenen Extraktes in die Dermis eingebracht und die dadurch hervorgerufene IgE-vermittelte (Lokal-) Reaktion beurteilt. Es werden standardisierte Testsubstanzen eingesetzt, die eine Mischung aus unterschiedlich relevanten Haupt- und Nebenallergenen beinhalten.

Als Kontraindikation zur Durchführung eines Hauttests gilt eine akute infektiöse Hauterkrankung im Testareal, zu den relativen Kontraindikationen gehören eine akute Ekzemerkrankung, gesteigerter Dermographismus, degenerative Hautveränderungen im Testareal und akut vorliegende saisonale Beschwerden auf die zu testende Substanz.

Die Möglichkeit eines falsch-positiven Testergebnisses kann durch eine irritative Reaktion aufgrund des Extraktes oder der mechanischen Manipulation im Zuge des Testvorganges hervorgerufen werden, außerdem durch eine möglicherweise vorliegende Urticaria factitia. Falsch-negative Resultate können bei zu geringer Substanzmenge bzw. Eindringtiefe und zu kurzer Einwirkzeit entstehen, insbesondere aber bei systemischer Medikamenteneinnahme wie oraler Antihistaminika, Kortikosteroide und Sympathomimetika. Auf diese sollte daher in der Woche vor der Testung verzichtet werden. Im Zweifelsfall wird die Reaktion auf die Kontrollsubstanz Histamin herangezogen, um die Gültigkeit des Tests zu bewerten (2).

Die Vorteile des Skin-Prick-Tests liegen in der einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit bei gleichzeitig hoher Sensitivität und recht guter Spezifität. Es wird ein Tropfen der zu testenden Substanz auf den Unterarm der Testperson aufgetragen und die Haut mittels einer Lanzette geritzt. Nach 20 Minuten kann die Reaktion abgelesen werden. Bei einer vorliegenden Sensibilisierung kommt es zu einer Soforttypreaktion, die sich durch eine akut auftretende Quaddel auf erythematösem Grund manifestiert. Unter Berücksichtigung des Durchmessers der entstandenen Quaddel, besteht die Möglichkeit einer semi-quantitativen Beurteilung.

Im Vergleich zur IgE-Serologie, welche nicht immer gut mit den klinischen Symptomen der Allergie übereinstimmen, ist der Skin-Prick-Test eine gute

Möglichkeit, um die biologische Aktivität der Allergene, im Sinne eines Provokationstests, zu überprüfen (27).

4.3.3 In-vitro-Testverfahren (Immunoassay)

Die Bestimmung von spezifischem und Gesamt-IgE ist bei anamnestisch ermitteltem Verdacht auf Vorliegen einer Allergie indiziert, insbesondere wenn ein Pricktest primär nicht durchgeführt werden kann, beispielsweise bei zu erwartender besonders starker Reaktion auf das Testsubstrat, bestehender Schwangerschaft, Hautveränderungen im Testareal, mangelnder Kooperation der Testperson und nicht absetzbarer Immunsuppression.

4.3.3.1 Messung Gesamt-IgE (Phadia ImmunoCAP)

Zunächst reagiert das, kovalent an den ImmunoCAP gebundene, Anti-IgE mit dem Gesamt-IgE im Patientenserum, nach dem Auswaschen werden Enzymgebundene Antikörper gegen IgE zugesetzt, um Komplexe zu bilden. Danach werden überschüssige Anti-IgE ausgewaschen und die Fluoreszenzreaktion auf das weiters hinzugefügte Enzym-Substrat gemessen, die Stärke der Fluoreszenz ist direkt proportional der IgE-Konzentration im Serum des getesteten Patienten. Die Messbreite beträgt 2-5000 kU/l, der Normbereich liegt dabei zwischen 0 und 100 kU/l (38, 39).

4.3.3.2 Messung allergen-spezifisches IgE (Phadia ImmunoCAP)

Ähnlich der Messung des Gesamt-IgE, kommt es auch hierbei zunächst zum Kontakt von Patientenblut mit dem kovalent an den ImmunoCAP gebundenen spezifischen Allergen, welches mit den spezifischen Antikörpern aus dem Patientenserum reagiert. Anschließend wird das nicht-spezifische IgE ausgewaschen, und Enzym-markierte Antikörper gegen die IgE werden hinzugefügt, um Komplexe zu bilden. Die überschüssigen Anti-IgE werden nach der Inkubationszeit wiederum ausgewaschen. Die daraufhin entstehende Fluoreszenzreaktion kann gemessen werden, und je höher die Fluoreszenz, desto größer ist der Gehalt von spezifischem IgE im Patientenserum. Es ist damit eine quantitative Bestimmung des IgE-Gehaltes möglich, der Messbereich erstreckt

sich dabei von 0,00-100 kU/l und ermöglicht eine Unterteilung in sechs CAP-RAST-Klassen, wobei ein Wert zwischen 0,00 und 0,35 einer CAP-RAST-Klasse 0 und somit dem Normalbefund entspricht (40).

5 ERGEBNISSE

5.1 Lieschgraspollen-Allergene (Phl p 1, 5b, 7, 12)

Im Rahmen der Studie wurden 41 Personen untersucht, bei denen wegen der typischen saisonalen Beschwerden sowie der entsprechenden Ergebnisse im Skin-Prick-Test eindeutig eine Allergie auf Lieschgraspollen diagnostiziert werden konnte.

Im Rahmen der Studie wurde auf die vier wichtigen rekombinanten Allergene Phl p 1, 5b, 7 und 12 ge-testet (Tab. 5.1). Die Allergene Phl p 1 und Phl p 5b gehören dabei zu den Hauptallergenen des Lieschgrases und sind mit großer Wahrscheinlichkeit in den derzeit verwendeten Immuntherapeutika enthalten, während Phl p 7 und Phl p 12 Nebenallergene darstellen, die in Impfstoffen vermutlich nicht vorhanden sind, sie dienen aber der Informationsgewinnung bezüglich einer möglicherweise vorliegenden Kreuzallergie.

Tabelle 5.3: IgE-Auswertung Lieschgraspollen-Allergiker

Fall-Nr.	Pat.-ID	Prick	IgE tot. kU/l	IgE g6 kU/l	IgE Phl p 1 kU/l	IgE Phl p 5b kU/l	IgE Phl p 7 kU/l	IgE Phl p 12 kU/l
1	6	++	197,00	24,80	18,50	13,80	0,00	0,00
2	10	++	57,40	0,64	1,14	0,00	0,00	0,00
3	11	++	302,00	21,50	11,90	3,51	0,00	0,00
4	12	++	41,10	1,54	1,63	0,00	0,00	0,00
5	14	++	206,00	15,10	3,08	9,64	0,00	0,00
6	15	++	141,00	11,60	5,69	9,33	0,00	1,51
7	16	++	216,00	32,90	9,16	19,40	0,00	0,00
8	17	++	451,00	39,20	6,81	31,60	0,00	0,00
9	18	++	412,00	81,50	38,80	56,90	0,00	0,00
10	19	++	37,60	2,01	2,07	0,00	0,00	0,00
11	20	++	3952,00	23,30	31,60	0,00	0,00	0,00
12	23	++	882,00	100,0	>100	>100	0,00	0,00
13	24	+	25,80	0,92	0,00	0,00	0,00	0,00
14	25	++	84,00	6,63	6,04	0,00	0,00	0,00
15	29	++	86,10	12,20	3,99	3,20	0,00	1,41
16	30	++	223,00	27,70	23,00	0,00	0,00	0,00
17	31	++	68,60	15,00	3,63	9,57	0,00	0,46
18	32	++	66,40	14,00	4,22	7,09	0,00	0,00
19	33	++	55,80	17,70	11,70	6,53	0,00	0,00
20	35	++	708,00	27,40	5,04	8,14	0,00	0,00
21	36	++	78,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22	38	++	18,60	6,31	5,91	0,00	0,00	0,00
23	39	++	331,00	63,90	17,60	42,00	0,00	3,74

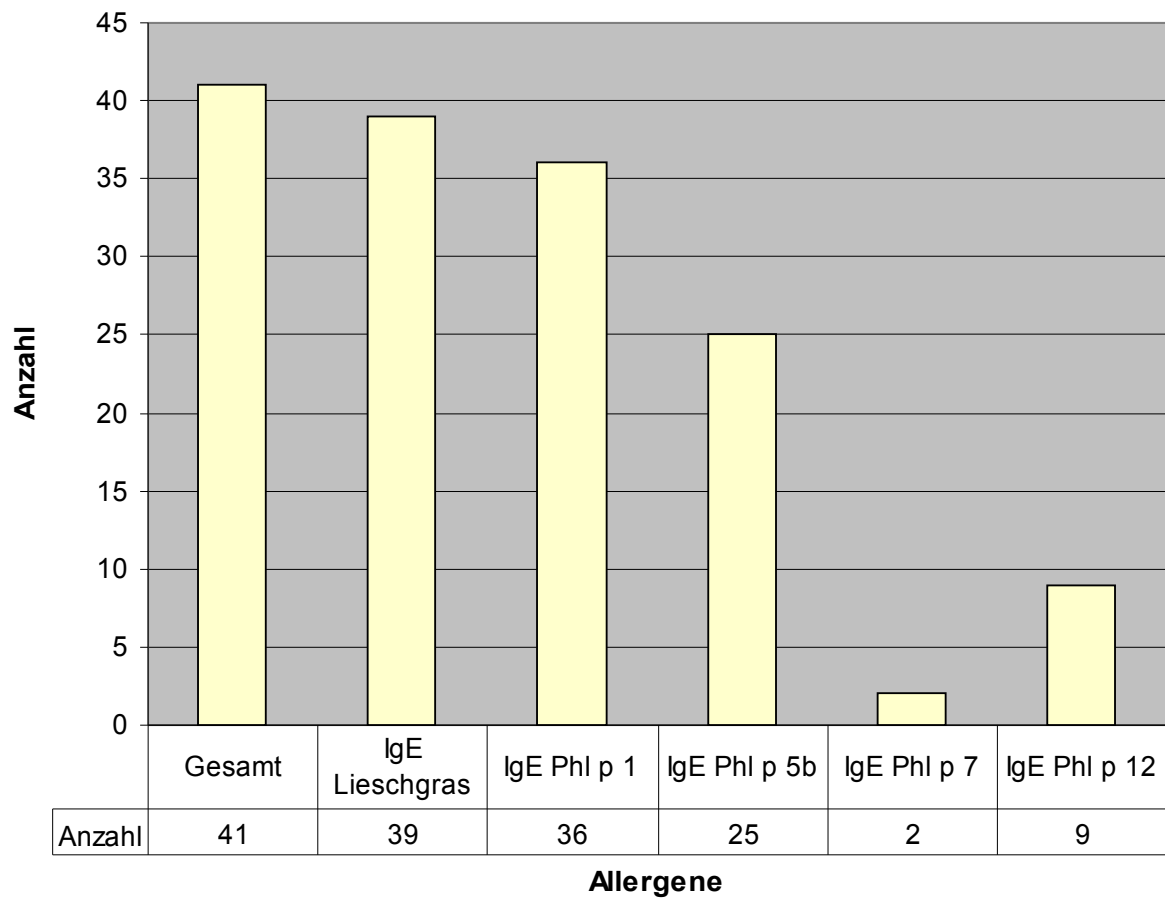
Fall-Nr.	Pat.-ID	Prick	IgE tot. kU/l	IgE g6 kU/l	IgE Phl p 1 kU/l	IgE Phl p 5b kU/l	IgE Phl p 7 kU/l	IgE Phl p 12 kU/l
24	41	++	192,00	42,70	24,80	44,60	0,00	0,00
25	42	++	63,80	12,90	17,20	8,04	0,00	0,00
26	43	++	5000,00	100,0	>100	35,00	0,51	16,10
27	44	+	93,80	2,18	0,00	0,00	0,00	0,00
28	45	++	144,00	15,10	6,16	5,05	0,00	0,00
29	46	++	139,00	1,07	0,00	0,00	0,00	2,01
30	48	++	371,00	3,50	5,26	0,00	0,00	0,00
31	49	++	625,00	0,84	1,66	0,00	0,00	0,00
32	50	++	227,00	41,10	19,20	16,40	0,00	0,78
33	51	++	452,00	8,91	9,82	0,00	0,00	0,00
34	52	++	50,00	14,30	9,06	11,90	0,00	0,00
35	53	++	244,00	28,40	15,90	15,30	0,00	0,93
36	57	++	1773,00	100,0	>100	>100	>100	4,46
37	59	++	41,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
38	61	+	821,00	6,77	0,78	0,00	0,00	0,00
39	63	++	161,00	42,10	26,10	25,00	0,00	0,00
40	64	+	1072,00	95,20	74,30	94,70	0,00	0,00
41	65	++	163,00	14,70	4,00	9,55	0,00	0,00

Erklärung: Prick ++: Durchmesser spez. Allergenextrakt > Durchmesser Histamin, +: Durchmesser spez. Allergenextrakt < Durchmesser Histamin; IgE g6: spez. IgE Lieschgras;

Die Auswertung ergibt nun, dass von den 41 getesteten und symptomatischen Patienten 39 Personen (95,1 %) Antikörper gegen das Lieschgraspollenextrakt gebildet haben, diese waren im Immunoassay bei Verwendung von Allergenextrakten nachweisbar. Bei der Untersuchung mittels rekombinanter Allergene konnte bei 36 Personen (87,8 %) eine Sensibilisierung auf Phl p 1 nachgewiesen werden, bei 25 Personen (61,0 %) auf Phl p 5b, bei nur 2 Personen (4,9 %) auf das Ca⁺⁺-bindende Protein Phl p 7, und bei 9 Patienten (22,0 %) waren Antikörper auf das Gräser-Profilin Phl p 12 vorhanden (Abb. 5.1).

Abgesehen davon wie häufig Sensibilisierungen auf die einzelnen Allergene auftreten, ist gerade für weitere Überlegungen hinsichtlich des therapeutischen Vorgehens, das gesamte Sensibilisierungsmuster jedes einzelnen Patienten von Bedeutung. Dabei lassen sich bei Lieschgraspollen-Allergikern, je nach Vorliegen einer Sensibilisierung auf Haupt- und Nebenallergene, einige relevante Kombinationsmöglichkeiten beobachten, die eventuell für die Art der weiteren Behandlung ausschlaggebend sein können.

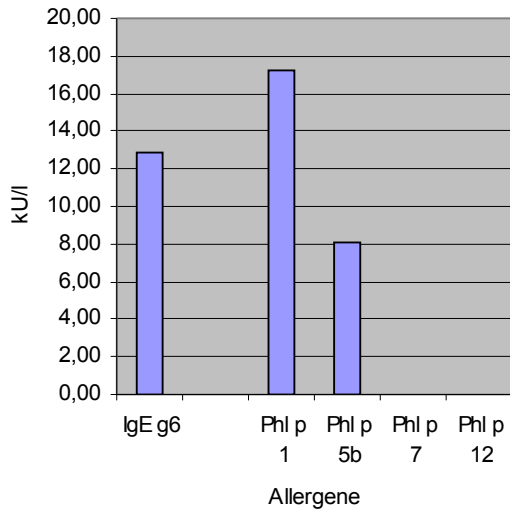
Abbildung 5.2: Häufigkeit der Sensibilisierungen auf die einzelnen getesteten Lieschgras-Allergene (n=41)



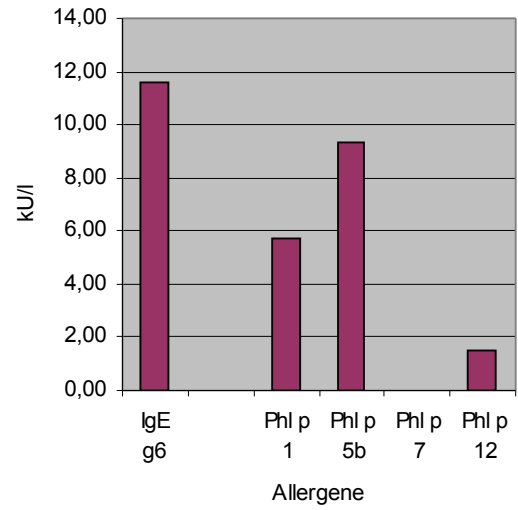
Dabei bietet sich die Unterteilung in vier Gruppen an (Abb. 5.3). In Gruppe 1 (Abb. 5.2 Bsp. 1) fallen dabei alle Patienten, die auf die Hauptallergene Phl p 1 und Phl p 5b sensibilisiert sind, aber nicht auf die Nebenallergene Phl p 7 und Phl p 12. Unter den getesteten Personen machte diese Gruppe mit 41,5 % den größten Anteil aus. In Gruppe 2 (Abb. 5.2 Bsp. 2) fällt man, wenn man auf beide Hauptallergene, aber auch auf Phl p 7 und/oder Phl p 12 allergisch reagiert, diese Konstellation konnte bei 19,5 % aller Studienteilnehmer nachgewiesen werden. In der Gruppe 3 (Abb. 5.2 Bsp. 3) befinden sich Personen, die nur auf eines der Hauptallergene Phl p 1 oder Phl p 5b sensibilisiert sind und auf Nebenallergene positiv oder negativ reagieren, dies war wiederum bei 26,8 % der Patienten der Fall. In Gruppe 4 (Abb. 5.2 Bsp. 4) zuletzt fallen jene 12,2 % der Personen, die auf keines der Hauptallergene sensibilisiert waren und dabei entweder gegen kein, ein oder mehrere Nebenallergene IgE-Antikörper besaßen.

Abbildung 5.3: Ausgewählte Sensibilisierungsprofile Gräser

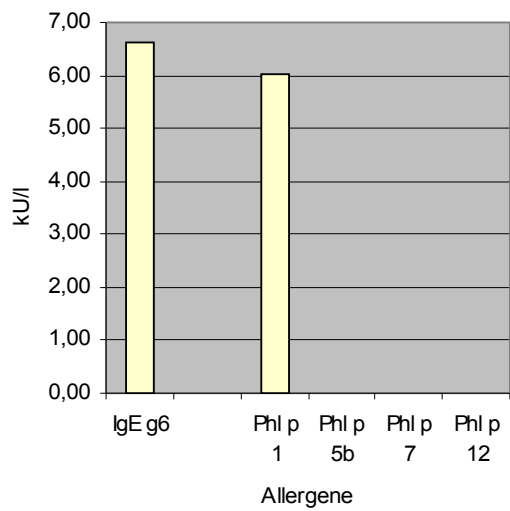
Beispiel Gruppe 1: Pat. Nr. 42



Beispiel Gruppe 2: Pat. Nr. 15



Beispiel Gruppe 3: Pat. Nr. 25



Beispiel Gruppe 4: Pat. Nr. 46

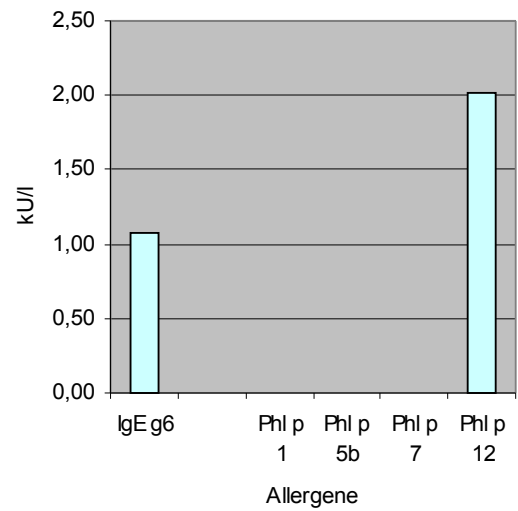
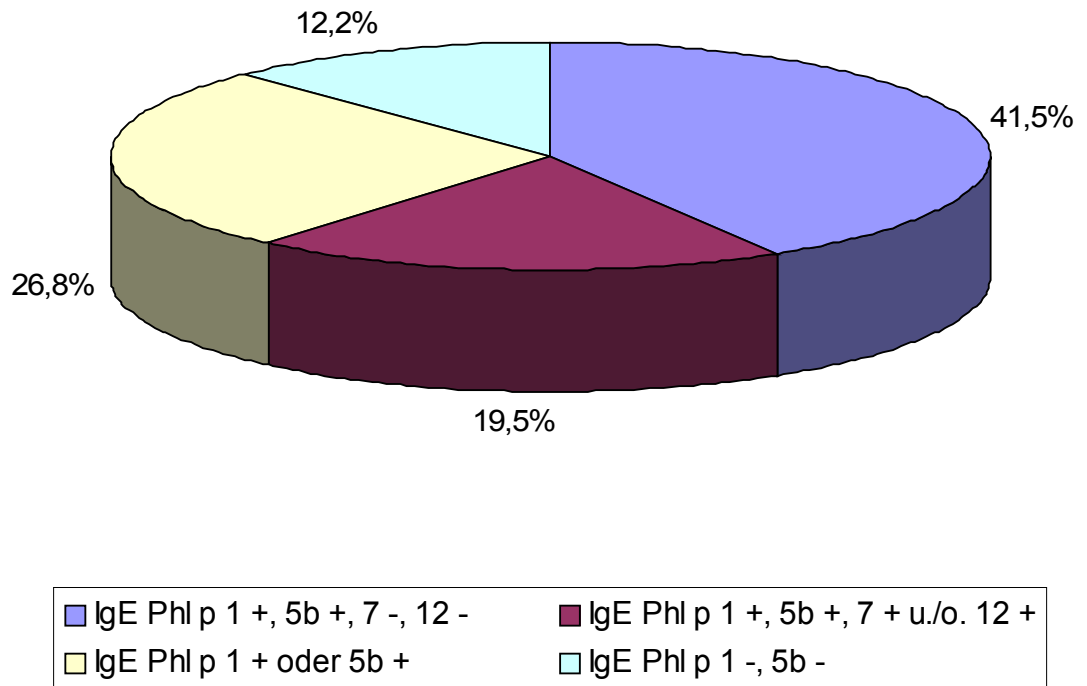


Abbildung 5.4: Vorkommen der verschiedenen Sensibilisierungsmuster bei Lieschgraspollen-Allergikern (n=41)



5.2 Birkenpollen-Allergene (Bet v 1, 2, 4)

Der erste Schritt in der exakten allergen-basierten Diagnostik auf Birkenpollen ist nun, wie auch zuvor, die Erstellung eines Allergenprofils der zu untersuchenden Person auf die Allergene, welche für weitere therapeutische Überlegungen von Bedeutung sein könnten (Tab. 5.2). Dabei können wir wieder davon ausgehen, dass Bet v 1 als alleiniges Hauptallergen in allen derzeit erhältlichen Impffextrakten in ausreichender Menge vorhanden sein sollte, während eine Untersuchung unter Verwendung der rekombinanten Allergene Bet v 2 und Bet v 4 gerade im Hinblick auf das Vorliegen von Kreuzallergien von vorrangiger Bedeutung sein dürfte.

Tabelle 5.4: IgE-Auswertung Birkenpollen-Allergiker

Fall-Nr.	Pat.-ID	Prick	IgE tot. kU/l	IgE t3 kU/l	IgE Bet v 1 kU/l	IgE Bet v 2 kU/l	IgE Bet v 4 kU/l
1	1	++	5,10	0,57	0,55	0,00	0,00
2	2	++	156,00	67,90	69,50	0,00	0,00
3	4	+	238,00	0,35	0,00	0,00	0,00
4	5	++	70,70	7,22	4,95	0,00	0,00
5	8	++	102,00	29,10	61,80	0,00	0,00
6	9	++	136,00	30,40	22,70	0,00	0,00
7	10	++	57,40	5,30	6,85	0,00	0,00
8	14	++	206,00	4,87	4,06	0,00	0,00
9	15	++	141,00	20,50	17,40	1,49	0,00
10	16	++	216,00	18,60	16,60	0,00	0,00
11	17	++	451,00	70,70	53,40	0,00	0,00
12	18	++	412,00	30,60	30,60	0,00	0,00
13	20	++	3952,00	100,00	>100	0,00	0,00
14	22	++	93,90	23,60	57,40	0,00	0,00
15	26	++	98,10	53,00	28,10	0,00	0,00
16	27	++	97,80	17,00	13,40	0,00	0,00
17	28	++	116,00	13,00	11,60	0,61	0,00
18	29	++	86,10	26,60	17,10	2,16	0,00
19	31	++	68,60	15,70	17,10	0,00	0,00
20	35	++	708,00	100,00	67,00	0,00	0,00
21	37	++	74,00	56,20	58,20	0,00	0,00
22	39	++	331,00	41,90	35,30	5,17	0,00
23	43	++	5000,00	100,00	>100	13,50	0,41
24	45	++	144,00	2,79	3,32	0,00	0,00
25	46	++	139,00	26,40	31,30	2,50	0,00
26	49	++	625,00	48,50	65,20	0,00	0,00
27	50	++	227,00	50,10	68,80	1,36	0,00
28	51	++	452,00	12,90	12,70	0,00	0,00
29	52	++	50,00	4,49	5,73	0,00	0,00
30	53	++	244,00	8,17	8,10	0,50	0,00
31	54	++	317,00	0,36	0,36	0,00	0,00
32	56	++	278,00	70,70	82,00	0,00	0,00

Fall-Nr.	Pat.-ID	Prick	IgE tot. kU/l	IgE t3 kU/l	IgE Bet v 1 kU/l	IgE Bet v 2 kU/l	IgE Bet v 4 kU/l
33	64	+	1072,00	0,57	0,00	0,00	0,00
34	65	++	163,00	2,27	2,44	0,00	0,00

Erklärung: Prick ++: Durchmesser spez. Allergenextrakt > Durchmesser Histamin, +: Durchmesser spez. Allergenextrakt < Durchmesser Histamin; IgE t3: spez. IgE Birke;

Damit ließ sich erkennen, dass von den 34 untersuchten Patienten in der in-vitro-Diagnostik ebenso alle 34 Personen (100 %) auf das spezifische Birkenpollenextrakt mit IgE-Antikörper-Bildung reagierten. Unter Verwendung rekombinanter Allergene, ließen sich folgende Ergebnisse auswerten: 32 Personen (94,1 %) waren auf das Hauptallergen Bet v 1 sensibilisiert, auf das Profilin Bet v 2 immerhin noch 8 Patienten (23,5 %), während auf das Ca⁺⁺-bindende Protein Bet v 4 nur bei einem Teilnehmer (2,9 %) eine Sensibilisierung festgestellt werden konnte (Abb. 5.4).

Wiederum besteht die Möglichkeit, je nach Kombination der vorhandenen Sensibilisierungen, alle Patienten in Gruppen zu unterteilen, um Anhaltspunkte für die weitere Behandlung zu gewinnen. Im Falle der Birkenpollen-Allergiker bietet sich die Unterteilung in drei Gruppen an (Abb. 5.6): Zur Gruppe 1 (Abb. 5.5, Bsp. 1) werden Personen gezählt, die auf das Hauptallergen Bet v 1 positiv reagieren, nicht aber auf die Nebenallergene Bet v 2 und Bet v 4. Diese Konstellation trifft auf den Großteil der allergischen Personen zu, nämlich auf insgesamt 24 Patienten (70,6 %), während noch 8 Patienten (23,5 %) auf Bet v 1 sowie zumindest ein Nebenallergen sensibilisiert waren und daher Gruppe 2 (Abb. 5.5, Bsp. 2) zugeordnet werden. Bei nur 2 untersuchten Personen konnte, trotz eindeutig vorliegender, saisonal auftretender, Symptomatik auf Birkenpollen, keine Sensibilisierung auf das Hauptallergen Bet v 1 nachgewiesen werden, diese verbliebenen 5,9 % bilden nun Gruppe 3 (Abb. 5.5, Bsp. 3).

Abbildung 5.5: Häufigkeit der Sensibilisierungen auf die einzelnen getesteten Birken-Allergene (n=34)

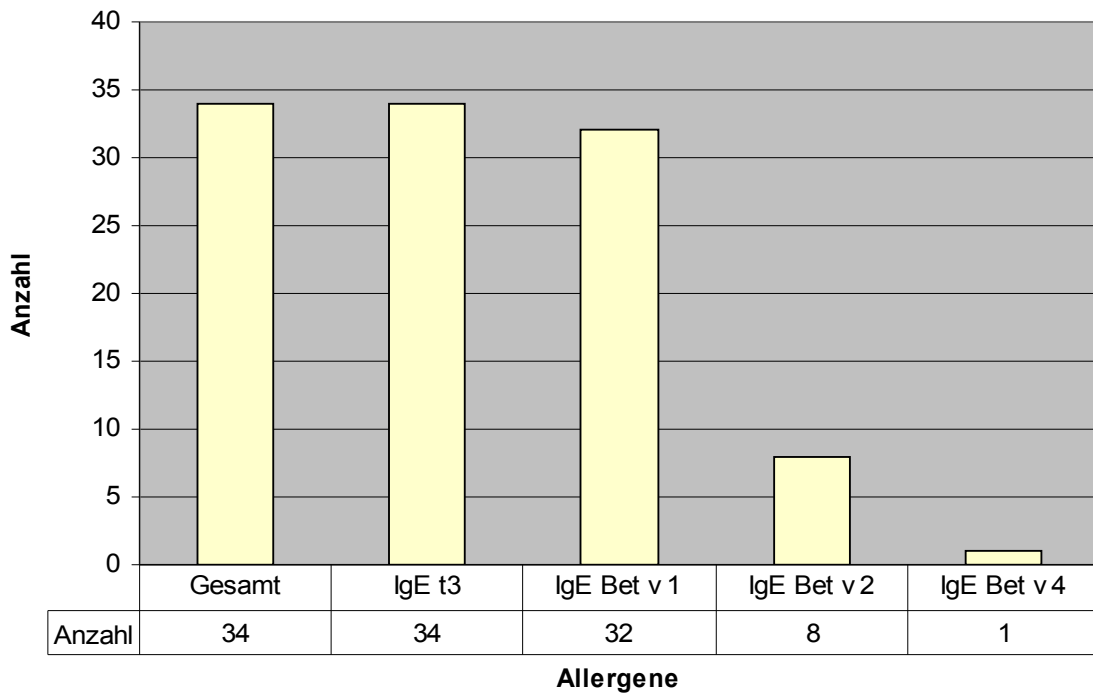
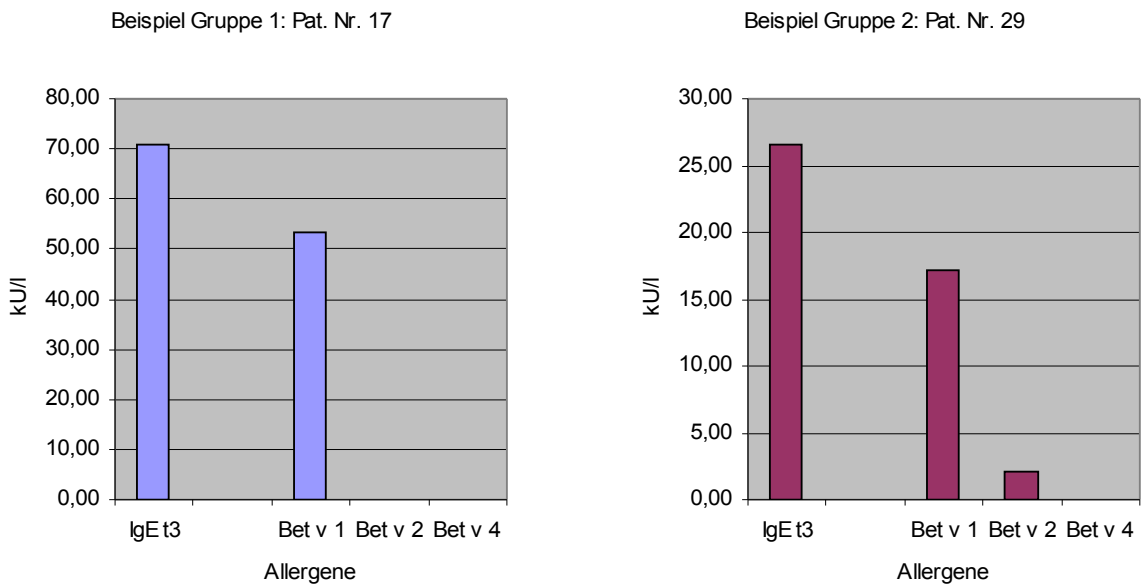


Abbildung 5.6: Ausgewählte Sensibilisierungsprofile Birke



Beispiel Gruppe 3: Pat. Nr. 64

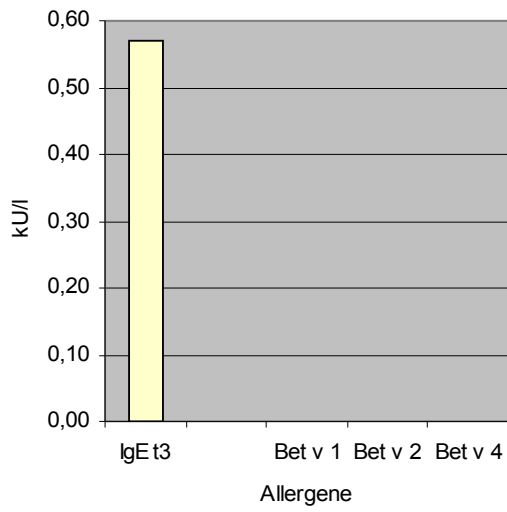
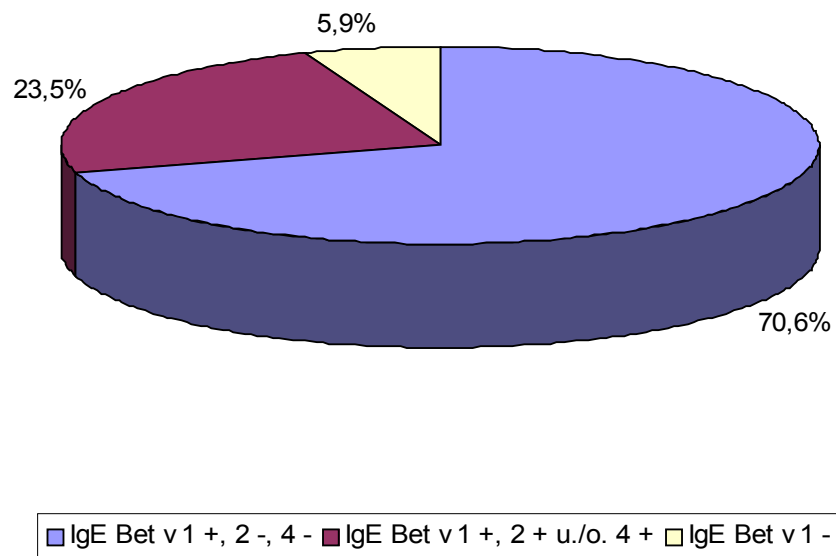


Abbildung 5.7: Vorkommen der verschiedenen Sensibilisierungsmuster bei Birkenpollen-Allergikern (n=34)



5.3 Katzenhaar-Allergene (Fel d 1)

Über die Anwendung von rekombinanten Allergenen bei Katzenhaarallergikern gibt es bislang wenige Untersuchungen, es steht mit Fel d 1 auch nur ein rekombinant hergestelltes Allergen für die Diagnostik zur Verfügung (Tab 5.3).

Tabelle 5.5: IgE-Auswertung Katzenhaar-Allergiker

Fall-Nr.	Pat.-ID	Prick	IgE tot. kU/l	IgE e1 kU/l	IgE Fel d 1 kU/l
1	3	++	58,80	6,92	10,90
2	6	++	197,00	0,77	0,84
3	13	++	341,00	52,10	42,80
4	14	++	206,00	18,40	21,60
5	16	++	216,00	20,60	24,20
6	17	++	451,00	1,13	1,06
7	20	++	3952,00	31,00	42,90
8	21	++	267,00	5,03	4,99
9	25	++	84,00	2,98	3,87
10	35	++	708,00	1,62	1,43
11	39	++	331,00	0,51	0,57
12	40	++	1413,00	2,69	1,29
13	42	+	63,80	0,00	0,36
14	43	++	5000,00	39,90	68,00
15	45	++	144,00	20,80	18,00
16	46	++	139,00	0,00	0,00
17	48	++	371,00	43,50	66,30
18	51	++	452,00	3,16	3,35
19	57	+	1773,00	0,92	0,94
20	59	++	41,60	0,84	1,06
21	60	++	60,80	1,57	1,94
22	62	++	179,00	40,70	43,90
23	65	++	163,00	6,48	5,03

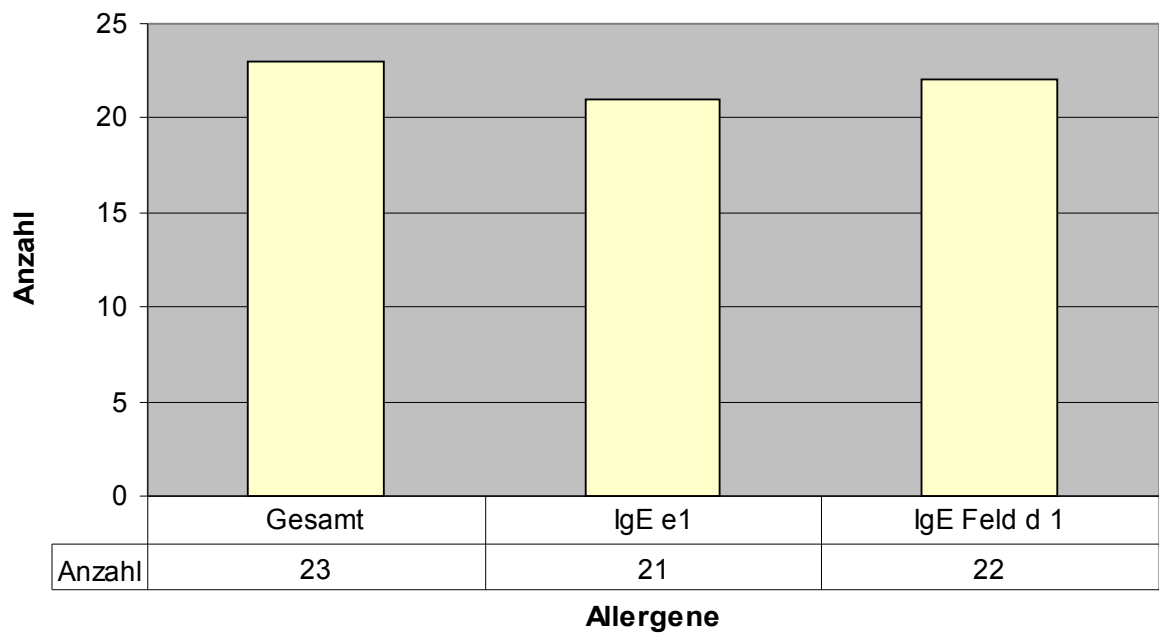
Erklärung: Prick ++: Durchmesser spez. Allergenextrakt > Durchmesser Histamin, +: Durchmesser spez. Allergenextrakt < Durchmesser Histamin; IgE e1: spez. IgE Katze;

In dieser Studie wurden 23 Katzenhaarallergiker untersucht, wovon bei 21 Teilnehmern (91,3 %) im Immunoassay eine Sensibilisierung auf das spezifische Katzenhaarextrakt nachweisbar war, während bei 22 Personen (95,7 %) IgE-Antikörper auf das rekombinant hergestellte Hauptallergen Fel d 1 gefunden wurden.

Da derzeit im Immunoassay nur auf ein einziges, isoliertes rekombinantes Katzenallergen getestet werden kann, besteht leider nicht die Möglichkeit, ein differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

Sensibilisierungsprofil zu erstellen, das vergleichbar mit jenem bei Gräser- oder Birkenpollenallergikern ist (Abb. 5.7).

Abbildung 5.8: Häufigkeit der Sensibilisierungen auf die einzelnen getesteten Katzenhaar-Allergene (n=23)



6 DISKUSSION

6.1 Allgemeine Bemerkungen

Durch den Einsatz rekombinanter Allergene in der Allergiediagnostik ist nun möglich, bei verschiedensten Allergien eine präzise Aussage über die einzelnen Allergene zu tätigen, gegen welche Sensibilisierungen vorliegen und die für entsprechende Beschwerden verantwortlich sind. Somit kann für jede, auf eine oder mehrere Substanzen, allergische Person ein individuelles Sensibilisierungsprofil erstellt werden, um die Immunantwort auf mehrere potentiell allergene Bestandteile der wichtigsten Allergenquellen zu messen.

Theoretisch könnte man nun diese rekombinant hergestellten Allergene bei jedem Patienten, anstelle der nach wie vor gebräuchlichen Allergenextrakte, verwenden, da sie eine höhere Aussagekraft bieten sollten, im folgenden Kapitel sollen die gewonnenen Resultate bei diagnostischer Verwendung noch einmal genauer betrachtet werden, insbesondere unter Berücksichtigung der momentan möglichen Therapie.

Auf die Detailergebnisse der einzelnen untersuchten Allergene wird im kommenden Abschnitt noch genauer eingegangen, einige Überlegungen im Zusammenhang mit dem sinnvollen Einsatz rekombinanter Allergene können aber als allgemein gültig erachtet werden und sollten deshalb im Voraus erwähnt werden.

Dazu gehört einmal, dass trotz der Befunderweiterung durch rekombinante Allergene in der Diagnostik, eine wesentliche Einschränkung dahingehend besteht, dass aktuell keine Möglichkeit der Immuntherapie verfügbar ist, bei der ebenfalls rekombinante Einzelallergene eingesetzt werden. Eine optimale Nutzung der Ressourcen kann sicher nur dann erzielt werden, wenn auch (entsprechend wirksame) Impfstoffe entsprechend des Allergenprofils zusammengestellt und appliziert werden können. In diesem Fall wäre eine CRD bei jedem Allergiker angezeigt, um eine optimale Einstellung der Therapie zu gewährleisten, indem nur mit exakt diesen Allergenen behandelt wird, gegen die beim jeweiligen Patienten eine Sensibilisierung vorliegt. Da diese Ideallösung einer CRT, aus verschiedenen Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

Gründen, in naher Zukunft voraussichtlich nicht verfügbar sein wird, kann die volle Stärke der rekombinant produzierten Allergene, auch in der Diagnostik, zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht ausgespielt werden.

Daraus ergibt sich, dass wir vorläufig auf die zurzeit erhältlichen Therapieoptionen angewiesen sind, welche aus gereinigten Extrakten der Allergenquellen hergestellt werden. Der Nachteil hierbei besteht darin, dass die exakten Bestandteile der jeweiligen Impfstoffe, je nach der vom Hersteller verwendeten Aufarbeitungsform, variieren bzw. genaue Inhaltsangaben teilweise gar nicht gemacht werden können. Sicher scheint dagegen, dass in den erhältlichen Extrakten zumindest die Hauptallergene der entsprechenden Allergenquelle in ausreichendem Maß enthalten sind, währenddessen über den Gehalt an Nebenallergenen, wie auch von weiteren allergenen oder nichtallergenen Substanzen teilweise Unklarheit besteht. Aufgrund der Unsicherheit, mit der die genaue Zusammensetzung eines Impfstoffes behaftet ist, kann auch der Informationsgewinn aus einer Diagnostik mit rekombinanten Allergenen nicht uneingeschränkt und ohne Vorbehalte weiter verwertet werden. Will man eine therapeutische Konsequenz aus den Untersuchungen ableiten, bietet sich in erster Linie an, das Vorhandensein einer Sensibilisierung auf die Hauptallergene zu ermitteln, da bei einem Fehlen dieser Reaktion eine Immuntherapie nicht angezeigt sein dürfte, während man bei einem positiven Ergebnis ein Ansprechen auf die Therapie erwarten darf.

6.2 Auswertung Lieschgraspollen-Allergene

Zunächst soll die Zuverlässigkeit der im Rahmen dieser Studie angewendeten Methoden betrachtet werden: Von den 41 an einer Gräserpollenallergie leidenden Personen, die untersucht wurden, konnte man serologisch bei 39 Personen spezifische IgE-Antikörper gegen das Gräserpollenextrakt nachweisen, das entspricht 95,1 % vom Gesamtkollektiv. Im Vergleich dazu konnte man bei 37 Patienten (90,2 %) eine IgE-Reaktivität auf mindestens eines der eingesetzten rekombinanten Allergene messen, die Sensitivität ist also etwas geringer als mit der derzeit üblicherweise verwendeten Methode, außerdem konnte anhand der

serologischen Tests kein Gräserpollenallergiker zusätzlich, durch die Verwendung rekombinanter Allergene diagnostiziert werden. Festzuhalten ist dabei, dass von den fünf mittels rekombinanter Gräserallergene negativ getesteten Personen, in zwei Fällen ebenfalls keine Reaktion auf das Gräserpollenextrakt nachweisbar war, während der höchste IgE g6-Level auf das Extrakt unter diesen fünf Patienten bei 2,18 kU/l lag.

Um eine höhere Genauigkeit bei den IgE-Untersuchungen erreichen zu können, bietet sich eventuell an, das Spektrum der eingesetzten, rekombinanten Allergene (Phl p 1, 5b, 7 und 12) um weitere verfügbare Einzel-Allergene zu erweitern.

Eine Fragestellung von besonderer Bedeutung ist, ob aufgrund der Anwendung von rekombinanten Allergenen in der Diagnostik sich daraus Konsequenzen in der Wahl der weiterführenden Therapie ergeben. Wenn man davon ausgehen darf, dass in den erhältlichen Impfextrakten nun insbesondere die Allergene Phl p 1 und Phl p 5b enthalten sind, nicht aber die stark kreuzreaktiven Nebenallergene Phl p 7 oder Phl p 12, dann kann man aus diesem Informationsgewinn heraus die Entscheidung treffen, ob eine kausale Immuntherapie oder die ausschließlich symptomatische Behandlung, etwa durch Verabreichung von Antihistaminika, gewählt wird. Dafür haben wir alle Gräserpollenallergiker entsprechend ihres Sensibilisierungsmusters in vier Gruppen unterteilt, um eine Abstufung für die Eignung zur Anwendung der Immuntherapie zu erreichen (Abb. 6.1).

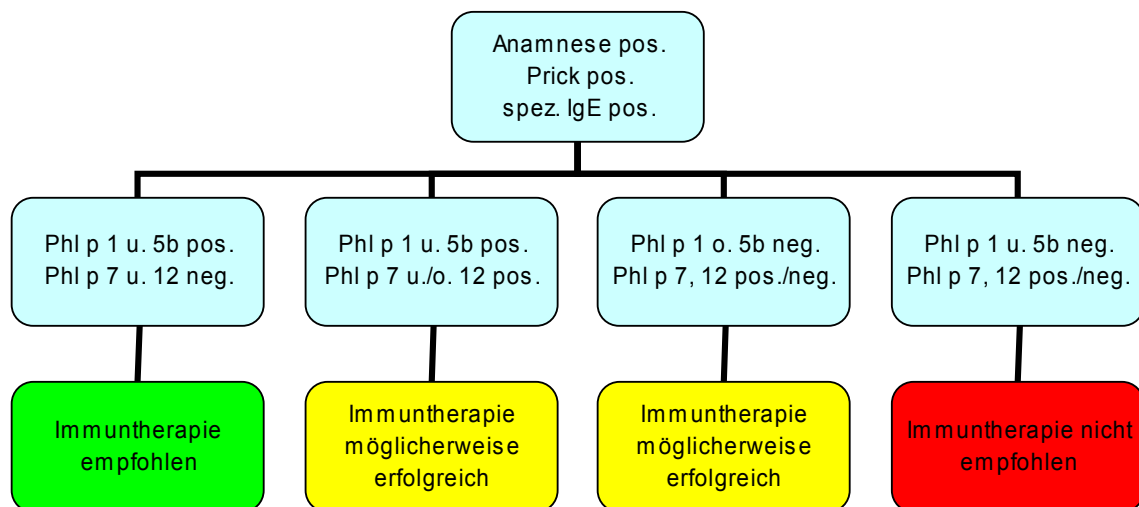
Entsprechend dieser Unterteilung in vier Gruppen ergibt sich, dass für 41,5 % der Gräserpollen-Allergiker eine Immuntherapie aufgrund des vorliegenden Sensibilisierungsmusters (Phl p 1 und 5b positiv, Phl p 7 und 12 negativ) nach derzeitigem Wissensstand eindeutig empfohlen wird.

Für Patienten, die den Gruppen 2 (Phl p 1 und Phl p 5b positiv, sowie zumindest auf ein weiteres Allergen positiv) und 3 (nur auf eines der beiden Hauptallergene Phl p 1 oder Phl p 5b positive Reaktion) zugeordnet werden, ist eine Immuntherapie nur eingeschränkt empfehlenswert, da im Fall der Gruppe 2 Antikörper gegen Allergene vorhanden sind, die nicht mit Sicherheit in Impfextrakten enthalten sind und daher die gewünschte Immunantwort womöglich nicht erwarten lassen. Bei Personen der Gruppe 3 dagegen wird im Rahmen einer

spezifischen Immuntherapie zumindest ein Allergen verabreicht, gegen das vor Therapiebeginn keine IgE-Antikörper vorlagen. Damit besteht die theoretische Möglichkeit einer Neusensibilisierung durch die Behandlung. Zu den Gruppen 2 und 3 kann man immerhin 46,3 % der auf Gräserpollen allergischen Personen zählen.

Aktuell nicht empfohlen wird die spezifische Immuntherapie Personen, die man Gruppe 4 zuordnet, diese machen in der Studienpopulation immerhin 12,2 % aus und sind auf keines der beiden Hauptallergene sensibilisiert. Hier besteht die Möglichkeit, dass sowohl Neusensibilisierungen auftreten, bzw. kann man auch nicht davon ausgehen, dass die Immuntherapie bei Bestehen einer Allergie ausschließlich auf Nebenallergene einen ausreichenden, immunmodulatorischen Effekt hervorrufen kann.

Abbildung 6.9: Möglicher Therapie-Algorithmus bei Vorliegen einer Gräserpollen-Allergie



Insgesamt ist also nur bei 41,5 % der Studienteilnehmer eine Immuntherapie uneingeschränkt empfehlenswert, bei 12,2 % aller Allergiker ist dagegen sogar gänzlich davon abzuraten (NNT: 8,2), weshalb bei der Fragestellung, ob eine Immuntherapie indiziert ist, in der Diagnostik von Gräserpollenallergikern durch die Verwendung rekombinanter Allergene eine Befunderweiterung erreicht werden Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

kann. Als Ersatz für die serologische Diagnostik mit Allergenextrakten ist die eingesetzte Kombination der vier rekombinanten Allergene jedoch aufgrund der etwas geringeren Sensitivität nicht geeignet, möglicherweise könnte, in Kombination mit weiteren rekombinanten Allergenen, eine noch größere Aussagekraft erreicht werden.

Bei insgesamt 22,0 % aller Gräserpollenallergiker konnte eine IgE-Antwort auf zumindest eines der kreuzreaktiven Nebenallergene Phl p 7 und/oder Phl p 12 nachgewiesen werden. Auffallend war, dass eine Antikörper-Antwort auf das Ca⁺⁺-bindende Protein Phl p 7 nur bei Personen beobachtet wurde, die gleichzeitig auch auf das Gräser-Profilin Phl p 12 reagierten, weiters hatten diese Patienten jeweils CAP-RAST-Klasse 6 (IgE > 100 kU/l) sowohl auf das Gräserpollenextrakt, als auch auf Phl p 1.

In mehr als einem Fünftel der Fälle wären somit prophylaktische Maßnahmen, aufgrund einer serologisch diagnostizierten Kreuzallergie angebracht, entsprechend der gewonnenen Ergebnisse scheint die alleinige Bestimmung des Profilins Phl p 12 (NNT 4,6), für die Überprüfung einer eventuell vorliegenden Neigung zu Kreuzreaktionen mit unterschiedlichsten Lebensmitteln, aber auch weiteren Pflanzen, ausreichend zu sein.

6.3 Auswertung Birkenpollen-Allergene

Im Gegensatz zu einer Allergie auf Gräserpollen, sind bei einer Sensibilisierung auf Birkenpollen die Reaktivitäts-Muster auf die einzelnen Allergene weniger komplex, dies in erster Linie aufgrund der Tatsache, da mit Bet v 1 nur ein einziges Hauptallergen bekannt ist. Wie bei Gräserpollen existieren aber auch in diesem Fall zwei bedeutende Nebenallergene (das Birkenprofilin Bet v 2 und das Ca⁺⁺-bindende Protein Bet v 4), die für die häufig auftretenden Kreuzreaktionen, in erster Linie mit zahlreichen Nahrungsmitteln, verantwortlich sind.

Von den 34 untersuchten Birkenpollen-Allergikern konnten alle 34 durch die Bestimmung der spezifischen IgE-Reaktion auf das Birkenpollenextrakt korrekt

diagnostiziert werden. Unter Verwendung der rekombinanten Methoden reagierten noch 32 Patienten (94,1 %) auf zumindest eines der drei eingesetzten Allergene. Wie auch bei Gräserpollenallergikern konnte durch die rekombinant hergestellten Allergene kein Patient zusätzlich diagnostiziert werden, jedoch betrug die Sensitivität des Extraktes bereits 100 %. Insgesamt war die Genauigkeit der rekombinanten Technik jener der extraktbasierten Diagnostik geringgradig unterlegen. Die beiden mit rekombinanten Mitteln nicht erkannten Allergiker befanden sich dabei allerdings im niedrigsten IgE-Bereich auch auf das Birkenpollenextrakt (IgE t3: 0,35 bzw. 0,57 kU/l). Obgleich der IgE-Level nicht mit dem Schweregrad der Symptomatik korrelieren muss, konnte man also feststellen, dass gerade bei Patienten ab einer CAP-RAST-Klasse 2 (IgE > 0,70 kU/l) die Sensitivität bei Verwendung der rekombinanten Birkenallergene in der Studie 100 % betrug.

Geht es nun darum, ob ein Patient im Einzelfall für eine spezifische Immuntherapie mit einem Birkenpollenextrakt geeignet ist, bietet sich auch hierbei die Aufteilung der Gesamtpopulation in Gruppen, entsprechend des vorliegenden Sensibilisierungsmusters, an. Aufgrund der im Gegensatz zur Lieschgraspollenallergie vergleichsweise geringeren Komplexität der vorliegenden Allergenprofile können wir diesmal eine Gliederung in drei Gruppen vornehmen (Abb. 6.2). Dabei muss man von der Annahme ausgehen, dass das einzige Hauptallergen der Birke, Bet v 1, in allen Impfstoffen in ausreichender Menge enthalten ist, während über den Gehalt der Nebenallergene Bet v 2 und Bet v 4 Unklarheit herrscht. Daher kann spekuliert werden, dass diese Allergene in der Regel nicht durch eine Immuntherapie verabreicht werden können.

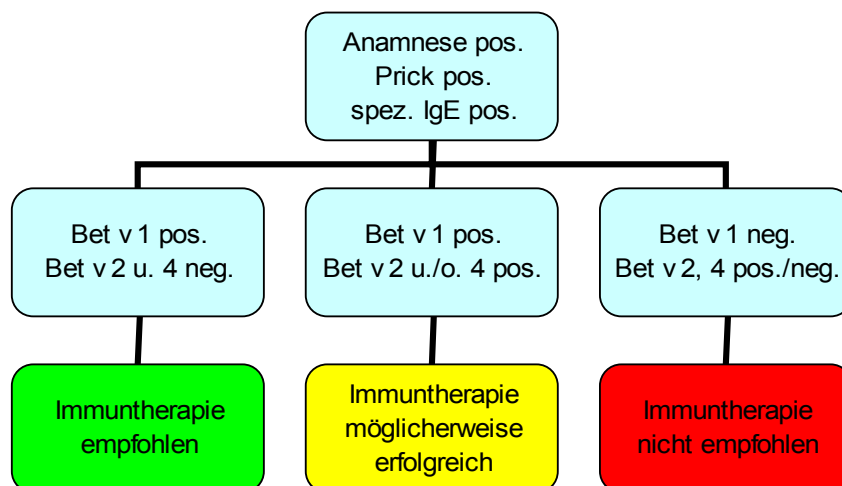
Entsprechend dem Therapiealgorithmus fallen in Gruppe 1 all jene Personen, die bei einer bestehenden symptomatischen Birkenpollenallergie IgE-Antikörper ausschließlich gegen Bet v 1 bilden. Bei den untersuchten Personen zählen somit 70,6 % der allergischen Patienten zur ersten Gruppe, für diesen größten Anteil aller getesteten Personen ist somit eine Immuntherapie angezeigt.

Eingeschränkt empfohlen wird die Behandlung mit Allergenextrakten jenen Personen, bei denen auf Bet v 1, aber auch auf zumindest eines der Nebenallergene Bet v 2 und/oder Bet v 4, serologisch Antikörper nachweisbar sind. Wie auch für Gräserpollen gilt hier, dass bei möglicherweise positivem

therapeutischem Effekt durch die Applikation von Bet v 1 nicht mit Sicherheit auch eine Besserung der Symptome erreicht werden kann, da die durch die Sensibilisierung auf Bet v 2 bzw. Bet v 4 ausgelösten Beschwerden durch eine Desensibilisierung mit Behandlung durch Bet v 1 vermutlich nicht beeinflusst werden können. In diese Gruppe, für die eine eingeschränkte Empfehlung zu einer spezifischen Immuntherapie gilt, fallen 23,5 % der untersuchten Patienten.

Für den rund 5,9 %igen Anteil der Studienteilnehmer, die der Gruppe 3 zugeteilt werden, da sie keine IgE-Antikörper gegen das Hauptallergen der Birke Bet v 1 bilden, wird, anstelle einer spezifischen Immuntherapie mit dem Birkenpollenextrakt, nur die symptomorientierte Behandlung der Allergie empfohlen. Man kann nämlich davon ausgehen, dass die Immunantwort auf Nebenallergene wie eben Bet v 2 und Bet v 4 durch die Verabreichung von Bet v 1 im Rahmen einer Therapie nicht beeinflusst werden kann.

Abbildung 6.10: Möglicher Therapie-Algorithmus bei Vorliegen einer Birkenpollen-Allergie



Im Vergleich zu der Untersuchung an Gräserpollenallergikern kann bei Vorliegen einer Allergie auf Birkenpollen, für 70,6 % der allergischen Personen die Immuntherapie eindeutig empfohlen werden, insgesamt könnte man, nach derzeitigem Stand, bei 94,1 % der Studienteilnehmer einen kausalen Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene

Therapieversuch durchführen. Im Gegensatz dazu sprach bei nur 2 untersuchten Patienten (5,9 %) das vorliegende Sensibilisierungsmuster gegen die Einleitung der Impftherapie (NNT: 17). Da bei einem derart hohen Anteil aller Untersuchten eine Sensibilisierung auf das Hauptallergen Bet v 1 vorliegt, ist der Einsatz der rekombinanten Allergene in der Diagnostik, um eine Immuntherapie zu rechtfertigen, weniger geeignet als etwa bei einer Gräserpollenallergie. Eine recht hohe Genauigkeit in der serologischen Diagnostik einer Birkenpollenallergie konnte mit der verwendeten Allergenkombination aus Bet v 1, 2 und 4 erfreulicherweise erreicht werden, dennoch konnte keine höhere Sensitivität erreicht werden, als bei Verwendung des Allergenextrakts. Aus diesen Gründen kann ein signifikanter Vorteil durch den Einsatz rekombinanter Birkenpollen-Allergene in der Diagnostik, wohl erst mit der Verfügbarkeit dieser Einzelallergene auch für therapeutische Zwecke, erreicht werden.

Die Untersuchung auf das Vorliegen einer Kreuzallergie bei Birkenpollenallergikern ergab ähnliche Ergebnisse, wie die Auswertung auf kreuzreaktive Gräserallergene. Bei 23,5 % der Untersuchten war eine Reaktion auf das Birkenprofilin Bet v 2 nachweisbar, und in dem einzigen Fall, einer positiven Reaktion auf das Ca⁺⁺-bindenden Protein Bet v 4, waren ebenfalls IgE-Antikörper auf Bet v 2 positiv und es bestand RAST-Klasse 6 (IgE > 100 kU/l) auf das Allergenextrakt sowie auf Bet v 1.

Eine routinemäßige Bestimmung insbesondere von Bet v 2 zur Abklärung einer Kreuzallergie (NNT 4,3), um möglicherweise vorbeugende Maßnahmen zu treffen, bietet sich daher an.

Unter allen 65 Teilnehmern an der Studie gab es insgesamt 21 Personen, das entspricht 50 % der Gräser- und 61,8 % der Birkenpollenallergiker, die, in der Anamnese erhoben, sowohl auf Birken- als auch auf Gräserpollen allergisch reagierten und bei denen diese Allergie durch den Pricktest sowie serologisch bestätigt werden konnte. Von diesen 21, auf den ersten Blick co-sensibilisierten Patienten, konnte bei 7 Personen (33,3 %) eine gleichzeitige Sensibilisierung auf das Gräserprofilin Phl p 12 und das Birkenprofilin Bet v 2 beobachtet werden. Hieraus ergibt sich, dass bei 77,8 % der auf Gräserprofilin und bei 87,5 % der auf Birkenprofilin sensibilisierten Personen gleichzeitig auch eine Sensibilisierung auf

zumindest noch ein zweites Profilin (im untersuchten Fall von der Birke bzw. den Gräsern) vorliegt.

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass bei bis zu 17,1 % aller Gräserpollenallergiker eine, durch die Profilinsensibilisierung auf Phl p 12 hervorgerufene, Kreuzallergie gegen Birkenpollen vorliegt. Unter Birkenpollenallergikern kann man sogar davon ausgehen, dass bis zu 20,6 % der Personen aufgrund ihrer IgE-Reaktivität auf Bet v 2 parallel auch Symptome bei einer Belastung durch Gräserpollen verspüren.

Die Zahl der untersuchten Personen, bei denen eine Sensibilisierung auf eines der Ca⁺⁺-bindenden Allergene Phl p 7 und/oder Bet v 4 gefunden wurde, war dagegen im untersuchten Kollektiv zu gering, um eine Aussage bezüglich ihrer Bedeutung im Zusammenhang mit dem Vorliegen einer Kreuzallergie zwischen der Birke und Gräsern zu treffen.

6.4 Auswertung Katzenhaar-Allergene

In der Diagnostik einer Katzenhaarallergie mittels rekombinanter Allergene stehen weniger Optionen zur Verfügung, als dies für Gräser- oder Birkenpollenallergene der Fall ist. Vorläufig ist mit dem Hauptallergen der Katze, Fel d 1, nur ein einziges rekombinant hergestelltes Allergen für die Diagnostik verfügbar. Es stellt sich nun die Frage, ob die Bestimmung der IgE-Antikörperantwort auf dieses Allergen eine Bereicherung zur derzeit üblichen Auswertung mit dem Katzenhaar-extrakt darstellt.

Aufgrund der Tatsache, dass vorerst nur ein rekombinantes Allergen abgesehen vom spezifischen Extrakt erhältlich ist, kann die Erstellung eines detaillierten Sensibilisierungs-Profiles, so wie es bei den zuvor genannten Pollen-Allergien eventuell sinnvoll ist, nicht durchgeführt werden. Wenn man die IgE-Auswertung der 23 Katzenhaarallergiker betrachtet, so kann man feststellen, dass bei 21 Personen (91,3 %) IgE-Antikörper auf das Katzenhaarextrakt nachweisbar waren, während sogar 22 Patienten (95,7 %) IgE-Antikörper auf Fel d 1, das rekombinant produzierte Hauptallergen der Katze, hatten. Damit war die Sensitivität bei Verwendung des rekombinanten Allergens zur serologischen

Diagnostik höher als mit der Extrakt-basierter Diagnostik. Auffällig ist jedoch, dass bei der einzigen, durch die rekombinante Technik zusätzlich diagnostizierten, Person der geringste IgE-Gehalt (0,36 kU/l) auf Fel d 1 unter allen positiv erkannten Personen nachweisbar war.

Das vorläufig sinnvollste Einsatzgebiet liegt wohl darin, auf das Vorhandensein des Allergens Fel d 1 untersuchen, um daraus die eventuelle Indikation für eine weitere kausale Therapie abzuleiten

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IgE	Immunglobulin E
TNF	Tumor Nekrose Faktor
MHC	Major Histocompatibility Complex
IL	Interleukin
CRD	Component-Resolved Diagnosis
CRT	Component-Resolved Therapy

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bousquet P, Chinn S, Janson C, Kogevinas M, Burney P, Jarvis D. Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I. *Allergy* 2007; 62(3):301–9.
2. Saloga J, Klimek L., Buhl R., Mann W., Knop J. *Allergologie-Handbuch: Grundlagen und klinische Praxis*. Stuttgart: Schattauer; 2006.
3. Anand M. K., Routes J. M. *Hypersensitivity Reactions, Immediate*; 2007 [cited 2008 Jul 23]. Available from:
URL:<http://www.emedicine.com/med/topic1101.htm#section~References>.
4. Simons FE. Allergic rhinobronchitis: the asthma-allergic rhinitis link. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 104(3 Pt 1):534–40.
5. Scheiner O, Kraft D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy* 1995; 50(5):384–91.
6. Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119(2):414–20.
7. Cromwell O, Suck R, Kahlert H, Nandy A, Weber B, Fiebig H. Transition of recombinant allergens from bench to clinical application. *Methods* 2004; 32(3):300–12.
8. Laffer S, Spitzauer S, Susani M, Pairleitner H, Schweiger C, Grönlund H et al. Comparison of recombinant timothy grass pollen allergens with natural extract for diagnosis of grass pollen allergy in different populations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996; 98(3):652–8.

9. Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK, Dhanaraj V, Pomés A. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106(3):409–18.
10. Rossi RE, Monasterolo G, Operti D, Operti R, Berlen R. Evaluation of IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, and Phl p 5) in a random sample of patients with specific IgE to *Phleum pratense*. *Allergy* 2000; 55(2):181–4.
11. Rossi RE, Monasterolo G, Monasterolo S. Measurement of IgE antibodies against purified grass-pollen allergens (Phl p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, and 12) in sera of patients allergic to grass pollen. *Allergy* 2001; 56(12):1180–5.
12. Jutel M, Cromwell O. Clinical results from vaccination with recombinant grass pollen allergens. *Clin. Dev. Immunol.* 2006; 13(2-4):389–94.
13. Wöhrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* 2006; 61(5):633–9.
14. Westritschnig K KDVR. Rekombinante Allergene in der Diagnose der Typ I Allergie. *J Lab Med* 2002; April(26):120–9.
15. Rossi RE, Monasterolo G, Monasterolo S. Detection of specific IgE antibodies in the sera of patients allergic to birch pollen using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4: evaluation of different IgE reactivity profiles. *Allergy* 2003; 58(9):929–32.
16. Movérare R, Elfman L, Vesterinen E, Metso T, Haahtela T. Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System. *Allergy* 2002; 57(5):423–30.

17. van Ree R. Indoor allergens: relevance of major allergen measurements and standardization. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119(2):270-7; quiz 278-9.
18. Tresch S, Holzmann D, Baumann S, Blaser K, Wüthrich B, Cramer R et al. In vitro and in vivo allergenicity of recombinant Bet v 1 compared to the reactivity of natural birch pollen extract. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33(8):1153–8.
19. Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Plozza TM, Dilworth RJ et al. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1988; 85(1):127–9.
20. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29(7):896–904.
21. Heiss S, Mahler V, Steiner R, Spitzauer S, Schweiger C, Kraft D et al. Component-resolved diagnosis (CRD) of type I allergy with recombinant grass and tree pollen allergens by skin testing. *J. Invest. Dermatol.* 1999; 113(5):830–7.
22. Jacobsen L, Nüchel Petersen B, Wihl JA, Løwenstein H, Ipsen H. Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. IV. Results from long-term (6-year) follow-up. *Allergy* 1997; 52(9):914–20.
23. Purello-D'Ambrosio F, Gangemi S, Merendino RA, Isola S, Puccinelli P, Parmiani S et al. Prevention of new sensitizations in monosensitized subjects submitted to specific immunotherapy or not. A retrospective study. *Clin. Exp. Allergy* 2001; 31(8):1295–302.
24. Bhalla PL, Singh MB. Biotechnology-based allergy diagnosis and vaccination. *Trends Biotechnol.* 2008; 26(3):153–61.
25. Harwanegg C, Laffer S, Hiller R, Mueller MW, Kraft D, Spitzauer S et al. Microarrayed recombinant allergens for diagnosis of allergy. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33(1):7–13.

26. Nelson HS. Allergen immunotherapy: where is it now? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119(4):769–79.
27. Valenta R, Niederberger V. Recombinant allergens for immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007; 119(4):826–30.
28. Asero R. Pollen specific immunotherapy is not a risk factor for de novo sensitization to cross-reacting allergens in monosensitized subjects. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2006; 16(4):253–7.
29. Inal A, Altintas DU, Yilmaz M, Karakoc GB, Kendirli SG, Sertdemir Y. Prevention of new sensitizations by specific immunotherapy in children with rhinitis and/or asthma monosensitized to house dust mite. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007; 17(2):85–91.
30. Valenta R, Vrtala S, Laffer S, Spitzauer S, Kraft D. Recombinant allergens. *Allergy* 1998; 53(6):552–61.
31. Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P et al. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens. *J. Exp. Med.* 1992; 175(2):377–85.
32. Tinghino R, Twardosz A, Barletta B, Puggioni EMr, Iacovacci P, Butteroni C et al. Molecular, structural, and immunologic relationships between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109(2):314–20.
33. Ebner C, Hirschwehr R, Bauer L, Breiteneder H, Valenta R, Ebner H et al. Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1995; 95(5 Pt 1):962–9.

34. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33(10):1443–9.
35. Ball T, Sperr WR, Valent P, Lidholm J, Spitzauer S, Ebner C et al. Induction of antibody responses to new B cell epitopes indicates vaccination character of allergen immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29(6):2026–36.
36. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005; 116(3):608–13.
37. Niederberger V, Horak F, Vrtala S, Spitzauer S, Krauth M, Valent P et al. Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101 Suppl 2:14677–82.
38. Phadia AB. ImmunoCAP Total IgE Product Description; 2006 [cited 2008 Sep 14]. Available from:
URL:http://www.immunocapinvitrosight.com/dia_templates/ImmunoCAP/Page__27695.aspx.
39. Dolen WK. IgE antibody in the serum--detection and diagnostic significance. *Allergy* 2003; 58(8):717–23.
40. Phadia AB. ImmunoCAP Specific IgE Product Description; 2006 [cited 2008 Sep 14]. Available from:
URL:http://www.immunocapinvitrosight.com/dia_templates/ImmunoCAP/Page__27690.aspx.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abbildungen

<i>Abbildung 3.1 Prävalenz ausgewählter Sensibilisierungen in der Bevölkerung (1).....</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 5.2: Häufigkeit der Sensibilisierungen auf die einzelnen getesteten Lieschgras-Allergene (n=41).....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 5.3: Ausgewählte Sensibilisierungsprofile Gräser.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 5.4: Vorkommen der verschiedenen Sensibilisierungsmuster bei Lieschgraspollen-Allergikern (n=41).....</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 5.5: Häufigkeit der Sensibilisierungen auf die einzelnen getesteten Birken-Allergene (n=34).....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 5.6: Ausgewählte Sensibilisierungsprofile Birke.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 5.7: Vorkommen der verschiedenen Sensibilisierungsmuster bei Birkenpollen-Allergikern (n=34).....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 5.8: Häufigkeit der Sensibilisierungen auf die einzelnen getesteten Katzenhaar-Allergene (n=23).....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 6.9: Möglicher Therapie-Algorithmus bei Vorliegen einer Gräserpollen-Allergie</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 6.10: Möglicher Therapie-Algorithmus bei Vorliegen einer Birkenpollen-Allergie.....</i>	<i>49</i>

Verzeichnis der Tabellen

<i>Tabelle 3.1: Wirkmechanismen der ausgeschütteten Mediatoren im Verlauf einer allergischen Typ-I-Reaktion (3).....</i>	<i>12</i>
<i>Tabelle 3.2: Übersicht aller, im Rahmen der Studie eingesetzten Allergene (2)</i>	<i>16</i>

<i>Tabelle 5.3: IgE-Auswertung Lieschgraspollen-Allergiker.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 5.4: IgE-Auswertung Birkenpollen-Allergiker.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 5.5: IgE-Auswertung Katzenhaar-Allergiker.....</i>	<i>41</i>

10 ANHANG

10.1 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Martin Semmelrock

Geburtsdatum: 07.12.1983

Geburtsort: Graz

Schulbildung

1990 – 1994 Volksschule Elisabeth in Graz

1994 – 2002 BG/BRG Lichtenfelsgasse in Graz

Universitäre Laufbahn

10/2002 – 06/2003 Studium der Rechtswissenschaften und Betriebswirtschaftslehre an der Karl-Franzens-Universität Graz

10/2003 – 05/2009 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz

Zusatzqualifikationen

seit 01/2009	Lehrtätigkeit am Ausbildungszentrum J. Bergler mit den Schwerpunkten Medizin und Erste Hilfe
05/2008 – 04/2009	Mitarbeit an der Univ.-Klinik für Dermatologie, LKH Graz; Betreuung einer klinischen Studie und Diplomarbeit (Titel: „Differenzierte Allergiediagnostik mittels rekombinanter Allergene“)
seit 01/2005	Ehrenamtlicher Mitarbeiter beim Roten Kreuz (Graz-Stadt), Ausbildungen zum: <ul style="list-style-type: none">• <i>Rettungssanitäter</i>• <i>Notfallsanitäter</i> mit Erwerb der zusätzlichen Kompetenzen für Arzneimittel (NKA) und Venenpunktion (NKV)• <i>Lehrsanitäter für Erste Hilfe</i>
2004 – 2006	Tätigkeit als Transplantationskoordinator an der Univ.-Klinik für Chirurgie, LKH Graz

Famulaturen

02/2005	Univ.-Klinik für Orthopädie, LKH Graz
07/2005	Interne Abteilung des KH der Barmherzigen Brüder Graz
09/2005	Univ.-Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, LKH Graz
07/2006	Interne Abteilung des KH der Barmherzigen Brüder Graz
02/2007	EBA der Medizinischen Univ.-Klinik, LKH Graz
07/2007	Univ.-Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, LKH Graz
04/2008	Univ.-Klinik für Dermatologie und Venerologie, LKH Graz