

*Extraktion und Identifizierung von Profilin, einem IgE-reaktiven Antigen, aus *Ascaris suum**

A. Obwaller¹, M. Duchêne², H. Auer¹, D. Kraft³ und H. Aspöck¹

Einleitung Die erhöhte Expression von spezifischem IgE und die damit in engem Zusammenhang stehende Eosinophilie gelten allgemein – neben der Bildung von spezifischem IgG – als typische Reaktion des Immunsystems auf eine Infestation/Infektion des Menschen mit Würmern. Den IgE-Antikörpern wird dabei einerseits protektive Wirkung zugeschrieben (2) – der genaue Wirkungsmechanismus ist allerdings weitgehend unbekannt – andererseits ist es eine Tatsache, daß ein Teil der klinischen Symptomatik bei Helminthosen (z. B. bei der Toxokarose) – ähnlich wie bei Allergien – durch Entzündungsreaktionen verursacht wird und nur durch eine Therapie mit Entzündungshemmern behandelt werden kann (1).

Während manche Pollenallergene bereits molekularbiologisch und physiologisch charakterisiert sind und ihre Wirkungsweise weitgehend aufgeklärt ist, ist über analoge Proteine bei Helminthen nur wenig bekannt. Das einzige gut beschriebene IgE-reaktive Helminthenantigen ist ABA-1, ein *Ascaris suum*-Protein mit 14 kDa schweren repetitiven Einheiten unbekannter Funktion und das zwar durchsequenzierte, aber nicht näher charakterisierte *Toxocara canis*-Homologon TBA-1 (4, 7).

Ziel unserer Studie war es daher, nach weiteren Proteinen mit stark IgE-reaktiven Eigenschaften zu suchen. Als aussichtsreichster „Kandidat“ bot sich Profilin an. Profiline sind als Aktin-bindende Proteine am Aufbau des Zytoskeletts aller Eukaryonten beteiligt (3); darüber hinaus ist bekannt, daß sie Anteil an der Inhibition der Bildung der „second messenger“ Moleküle Inositol-Triphosphat und Diacylglycerol haben (8, 9). Profilin wurde bereits als starkes Allergen in Pollen (11) und als IgE-reaktives Antigen in *Entamoeba histolytica* identifiziert (4). Da Profilin selbstverständlich auch in Helminthen vorkommt, haben wir versucht, Seren verschiedener Patienten- und Probandengruppen auf ihre IgE-Reaktivität gegen einen Profilinextrakt und gegen einen Gesamtextrakt aus *Ascaris suum*, einem in Mitteleuropa weit verbreiteten Parasiten, zu testen.

Material und Methoden	Adulte lebende männliche Exemplare von <i>A. suum</i> wurden in 3 cm lange Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Etwa 5 g dieses Materials wurden in 25 ml PHEM-Tx Puffer (120 mM Pipes, 50 mM Hepes, 20 mM EGTA, 4 mM MgCl ₂ , 10 mM Glukose, 1,5% TritonX100 und 1 mM PMSF und 20 mM Jodazetamid) gegeben und mit einem Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenat bei 2000 g (5 min, 4°C) und der Überstand noch einmal bei 35000 g zentrifugiert.
Antigene	
Gesamtextrakt aus <i>A. suum</i>	
Profilinextrakt aus <i>A. suum</i>	Poly-L-prolin wurde an CNBr aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Schweden) gekoppelt. 30 ml Gesamtextrakt und 20 ml Sepharose wurden zwei Stunden lang bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Proteine wurden mit 90 ml Tris/NaCl/ATP (20 mM Tris/Cl, 150 mM NaCl, 0,5 mM ATP; pH 7,6) abgetrennt. Das gebundene Profilin wurde mit 30 ml Tris/NaCl/ATP, 2M Harnstoff und anschließend mit 90 ml Tris/NaCl/ATP, 6 M Harnstoff eluiert. Die Eluate wurden gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.
SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	Die Antigene (Gesamtextrakt und Profilinextrakt) wurden mit einem 12%igem SDS-Polyakrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (6). Die Molekulargewichte der einzelnen Proteinbanden wurden nach den jeweils mitgeführten Proteinstandards (Amersham Int./England) bestimmt.
IgE-Immunoblot	Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese in einem Tris-Glyzin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20% Methanol pH 8,3) bei 150 mA, sechs Stunden auf Nitrozellulosemembranen (0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schüll, Kassel/Deutschland) geblottet. Die Nitrozellulose wurde anschließend in je 5 mm breite Streifen geschnitten und in Probenpuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7,5, 0,5% Rinderserumalbumin, 0,05% NaN ₃ , 0,5% Tween-20) zwei Stunden präinkubiert. Anschließend wurden die Nitrozellulose-Streifen mit den Patientenserum (1:4 in Probenpuffer verdünnt) überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Abwaschen ungebundener Antikörper mit Probenpuffer (30 min) wurden die Streifen mit dem im Probenpuffer 1:10 verdünnten Sekundärantikörper (¹²⁵ J-Kaninchen Antihuman-IgE, Pharmacia) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Pool von Humanserum, in denen keine spezifischen, gegen <i>Toxocara canis</i> -Antigen gerichteten IgG-Antikörper nachweisbar waren. Die Streifen wurden nach einem weiteren Waschgang getrocknet, auf Papier geklebt und in Exponierkassetten (X-Omatic, Kodak) auf einen „hyperfilm MP“ (RPN6, Amersham Int./England) gelegt und bei -70°C exponiert.
Patienten und Probandenkollektiv	In die Studie wurden 89 Seren einbezogen, die nach den klinischen Symptomen der Patienten/Probanden in 4 Gruppen eingeteilt wurden:
Gruppe 1	13 Seren von gesunden Personen mit spezifischem IgG gegen exkretorisch/sekretorisches (ES) Antigen von <i>T. canis</i> oder <i>A. suum</i> .
Gruppe 2	11 Seren von Patienten mit Typ I-Allergien und einem IgE-Titer von >1000 IU, aber ohne spezifisches IgG gegen ES-Antigen von <i>T. canis</i> oder <i>A. suum</i> .
Gruppe 3	34 Seren von Patienten mit spezifischem IgG gegen ES-Antigen von <i>T. canis</i> und mit Toxokarose-assoziiierter Symptomatik.
Gruppe 4	31 Seren von Patienten mit spezifischem IgG gegen ES-Antigen von <i>T. canis</i> oder <i>A. suum</i> , aber ohne genaue klinische Diagnose.

Tabelle 1:

IgE-Reaktivität von Seren von unterschiedlichen Patienten und Probandengruppen gegen Antigenextrakte.

Gruppe	IgE-Reaktivität gegen	
	A. suum-Extrakt (positiv/negativ)	Profilin-Extrakt (positiv/negativ)
Gruppe 1 (13 gesunde Probanden)	0/13	0/13
Gruppe 2 (11 Allergiker)	3/ 8	0/11
Gruppe 3 (34 Toxokarose-Patienten)	4/30	2/32
Gruppe 4 (31 TES-positive Probanden ohne spezifische Diagnose)	5/26	2/29
Total	12/77	4/85

Ergebnisse

Gesamtextrakt aus *A. suum*

Von insgesamt 89 getesteten Seren zeigten 12 IgE-Bindung an den *A. suum* Gesamtextrakt. Während kein Serum aus der Gruppe 1 (gesunde Probanden) reagierte, waren drei der 11 Seren aus der Gruppe der Typ I-Allergiker, vier der 34 Seren der Gruppe der Toxokarose-Patienten und fünf der 31 Patienten ohne klinische Diagnose IgE-reaktiv (Tab. 1). Die einzelnen Seren zeigten sehr unterschiedliche Bandenmuster (Abb. 1). Die Molekulargewichte der reaktiven Proteine reichten von 14 kDa bis über 200 kDa.

Profilinextrakt aus *A. suum*

Abbildung 2 zeigt das typische IgE-Bandenmuster im Immunoblot mit einer Bande bei etwa 14 kDa (monomeres Profilin) und drei höhermolekularen Polymeren. Gegen Profilin zeigte kein Serum der Gruppen 1 und 2 (gesunde Probanden und Typ I-Allergiker) IgE-Reaktivität, jedoch jeweils zwei Seren der Gruppen 3 (Toxokarose-Patienten) und 4 (Patienten ohne klinische Abklärung).

Diskussion

Ziel der Studie war es, einen Profilinextrakt – und vergleichend dazu einen Gesamtextrakt – aus *Ascaris suum* auf seine IgE-Reaktivität zu überprüfen, da sich aus Pollen sowie *Entamoeba histolytica* isoliertes Profilin als stark IgE-reaktives und Entzündungsreaktionen induzierendes Protein, das für einen Teil von Krankheitssymptomen, z. B. bei Allergien, verantwortlich sein kann, herausgestellt hat. Dafür wurden Seren von gesunden Probanden mit spezifischem IgG gegen E/S-Antigene von *Toxocara canis* oder *Ascaris suum* (Gruppe 1), Seren von Patienten mit Typ I-Allergien, aber ohne spezifische *Toxocara*- oder *Ascaris*-Antikörper (Gruppe 2), Seren von Patienten mit Toxokarose-assoziiierter Symptomatik und spezifischen *Toxocara*-Antikörpern (Gruppe 3) sowie Seren von Patienten mit spezifischen *Toxocara*-Antikörpern, aber ohne genaue klinische Diagnose (Gruppe 4), in einem *Ascaris suum*-Gesamt- und einem *Ascaris suum*-Profilinextrakt-Immunoblot auf spezifische IgE-Antikörper untersucht.

In unserer Studie konnten wir erstmals zeigen, daß man auch im Serum von Helminthosen-Patienten (Gruppe 3) oder Patienten mit spezifischen *Toxocara*-Antikörpern in Kombination mit einer – wenn auch unspezifischen/uncharakteristischen klinischen Symptomatik (Gruppe 4) – IgE-Antikörper nachweisen kann, die mit *Ascaris suum*-Profilinextrakt reagieren. Obwohl der Anteil der gegen Profilin IgE-reaktiven Seren mit 6,2% (4 von 65) – in den Patientengruppen 3 und 4 waren es je zwei – zunächst gering erscheinen mag, kommt diesem Befund außerordentlich große klinische Bedeutung zu; immerhin ist es vorstellbar, daß auch „Wurmprofile“, ähnlich wie auch aus Pollen isolierte Profile, eine Induktion oder Prolongation von Krankheitssymptomen durch Autoimmunreaktivitäten – hervorgerufen durch eine Sensibilisierung über Profilin – bewirken können (10).

Etwas überraschend war hingegen die Beobachtung, daß immerhin 12 der 85 untersuchten Seren (= 15,6%) mit dem Gesamtextrakt aus *Ascaris suum* reagierten. Obwohl der Parasit in Mitteleuropa weit verbreitet ist, stellt *Ascaris suum* in erster Linie einen Parasiten des Schweines dar, der wohl auch gelegentlich den Menschen befallen kann, in dem er aber nur extrem selten zum Adulttier heranwächst. Allerdings dürfte es doch kein so seltenes Ereignis sein, daß *Ascaris suum*-Eier (aerogen) auf Menschen übertragen werden und in manchen Fällen eine spezifische Antikörperproduktion initiieren. Aufgrund der Tatsache, daß sowohl neun Seren aus den Patientengruppen 3 (Toxokarose-Patienten) und 4 (TES-positive Patienten, ohne spezifische klinische Diagnose), die allerdings keine IgG-Antikörper gegen *Ascaris*-Antigen haben, als auch drei Seren aus der Gruppe 3

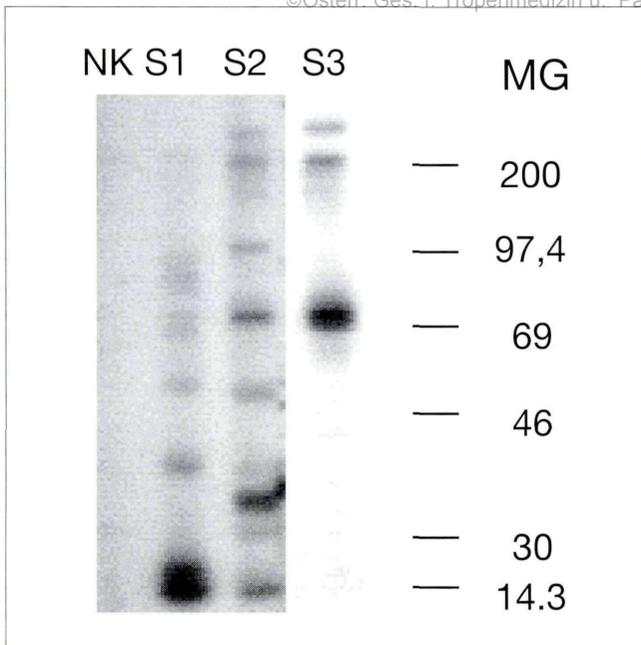


Abbildung 1:

Das IgE-Bandenmuster gegen den Extrakt aus adulten *A. suum* von drei repräsentativen Seren (S1-3; NK, Negativkontrolle). Die relativen Molekulargewichte der reaktiven Proteine reichen von 14 kDa bis über 200 kDa.

(Typ I-Allergiker) mit dem *Ascaris*-Gesamtextrakt reagierten, liegt der Schluß nahe, daß es sich dabei um Kreuzreaktivitäten handelt. Darüber hinaus war die große Heterogenität der Bindungsmuster zwischen den einzelnen IgE-reaktiven Seren (Abb. 1) und dem *Ascaris suum*-Gesamtextrakt auffällig, die in diesem Ausmaß beim IgG-Bandenprofil nicht festgestellt wurde. Offensichtliche Gesetzmäßigkeiten waren hier jedenfalls nicht erkennbar. Diese Tatsachen lassen daher den Schluß zu, daß es sich bei der Bildung von Antikörpern der Klasse E mehr um individuelle Ereignisse als um generelle Gesetzmäßigkeiten handelt.

Zusammenfassung

Profilin, eine ubiquitäre Komponente des Zytoskeletts, ist als starkes Allergen in Pollen und als IgE-reaktives Protein in *Entamoeba histolytica* identifiziert worden. Da Profilin auch in humanmedizinisch relevanten Parasiten vorhanden ist, haben wir einen Profilinextrakt – und zum Vergleich – einen Gesamtextrakt aus *Ascaris suum* auf ihre IgE-Reaktivitäten untersucht. Insgesamt wurden 13 Seren von gesunden Personen mit spezifischem IgG gegen exkretorisch/sekretorisches (ES) Antigen von *T. canis* oder *A. suum*, (Gruppe 1), 11 Seren von Patienten mit Typ I-Allergien (Gruppe 2), 34 Seren von Toxokarose-Patienten (Gruppe 3) und 31 Seren von Patienten mit spezifischem IgG gegen ES-Antigen von *T. canis* oder *A. suum*, aber ohne genaue klinische Diagnose (Gruppe 4) in einem Immunoblot gegen einen *A. suum*-Profilin- und vergleichend gegen einen Gesamtextrakt aus adulten *A. suum* auf spezifische IgE getestet.

Während keines der Seren aus den Gruppen 1 und 2 im Profilinextrakt-Immunoblot reagierte, zeigten je zwei Seren der Gruppen 3 und 4 deutlich positive Reaktionen; damit konnte erstmals *Ascaris*-Profilin als IgE-reaktives Protein bei Toxokarose-Patienten und Patienten mit unspezifischer/uncharakteristischer Symptomatik und spezifischem IgG-Spiegel gegen *Toxocara canis* E/S-Antigen nachgewiesen werden.

Im Gesamtextrakt-Immunoblot zeigten insgesamt 12 Seren IgE-Reaktivität; aufgrund der Tatsache, daß Seren aus allen drei Patientengruppen (2, 3 und 4) mit einzelnen Komponenten des Gesamtexttrakts reagierten, muß allerdings geschlossen werden, daß es sich dabei um Kreuzreaktivitäten handelt. Darüber hinaus zeigten die einzelnen Seren gegen *A. suum* Antigene ein sehr breites und sehr heterogenes Bandenmuster (zwischen 14 und >200 kDa), so daß angenommen werden muß, daß es sich bei der Bildung von IgE-Antikörpern eher um individuelle Ereignisse, als um generelle Gesetzmäßigkeiten handelt.

Schlüsselwörter

Ascaris suum, *Toxocara canis*, IgE, Profilin.

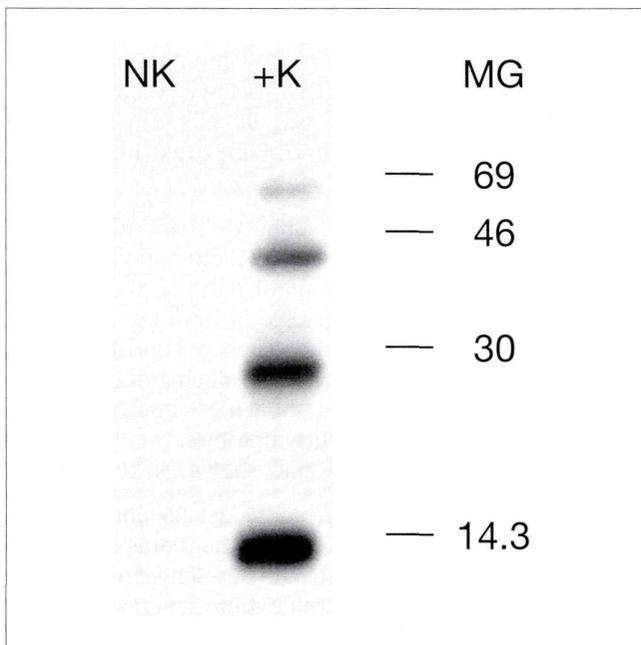


Abbildung 2:

Die IgE-Reaktivität des Profilinextraktes. Die Banden liegen bei etwa 14kDa (monomeres Profilin) und 28, 42 und 56 kDa (höhermolekulare Polymere; +K, reaktives Serum; NK, Negativkontrolle).

Summary *Extraction and identification of profilin from Ascaris suum as an IgE-reactive antigen*

In previous studies profilin, an ubiquitous component of the cytoskeleton, has been identified as an allergen in pollen and as an IgE-reactive antigen in *Entamoeba histolytica*. Since profilin is also present in parasites of medical relevance we have tested an extract of profilin and – in comparison – a total extract of adult *Ascaris suum* for their reactivity with human IgE. In total 13 sera from healthy persons with specific IgG against excretory/secretory (ES) antigens of *T. canis* or *A. suum* (group 1), 11 sera from patients with type-I allergies (group 2), 34 sera from patients suffering from toxocarosis associated symptoms (group 3) and 31 sera from patients with specific IgG against E/S antigens of *T. canis* or *A. suum* but without defined case history (group 4) were tested for their IgE-reactivity with profilin and somatic antigens extracted from *A. suum*.

Whereas none of the sera of group 1 and 2 reacted with profilin, 2 sera from group 3 and of group 4 showed strong IgE binding with the profilin extract. Thus, we could demonstrate the first time *Ascaris* profilin as an IgE reactive protein in toxocarosis patients as well as in patients with an unspecific/uncharacteristic symptomatology and specific IgG against *Ascaris* or *Toxocara* E/S-antigens.

In the immunoblot using a total somatic extract of *Ascaris* as antigen, 12 sera showed IgE-reactivity; however, due to the fact that also type-I allergics (group 2) showed IgE-reactivity it must be concluded that this binding is rather caused by cross reactivity than by specific binding. In addition the IgE binding pattern of these 12 sera against total *A. suum* antigens showed a rather high heterogeneity (several proteins between 14 and >200 kDa); thus this fact might be more a consequence of individual immune response than a general phenomenon.

Keywords *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, IgE, profilin.

Literatur

1. AUER, H., ASPÖCK, H. (1995):
Toxokarose in Österreich – Epidemiologie, Diagnostik und Therapie.
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 17, 61-70.
2. CAPRON, M., CAPRON, A. (1994):
Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis.
Science 264, 1876-1877.
3. CARLSON, L., NYSTRÖM, L.-E., LINDBERG, U., KANNAN, K.K., CID-DRESDNER, H., LÖVGREN, S. JÖRNVALL, H. (1976):
Crystallisation of a non-muscle actin.
J. Mol. Biol. 105, 353-366.
4. CHRISTIE, J. F., DUNBAR, B., KENNEDY, M. W. (1993):
The ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris suum*: epitope stability, mass spectrometry, and N-terminal sequence comparison with ist homologue in *Toxocara canis*.
Clin. Exp. Immunol., 92, 125-132.
5. DUCHÉNE, M., ORTNER, S., WIEDERMANN, G., KRAFT, D., SCHEINER, O., VALENTA, R. (1992):
In : *Entamoeba histolytica* profilin binds serum IgE from pollen allergic patients, 173-175.
Kraft, D., Sehon, A. (Hrsg):
Molecular biology and immunology of allergens.
1. Aufl., CRC Press, Boca Raton.
6. LAEMMLI, J.H. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.

7. MCGIBBON, A. M., CHRISTIE, J. F., KENNEDY, M. W., LEE, T. D. G. (1990):
Identification of the major *Ascaris* allergen and its purification to homogeneity by HPLC.
Molec. Biochem. Parasitol. 39, 163-172.
8. SOHN, R. H., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. (1994):
Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton.
Bioassays, 16, 465-472.
9. THERIOT, J. A., MITCHISON, T. J. (1993):
The three faces of profilin.
Cell, 75, 835-838.
10. VALENTA, R., DUCHÊNE, M., PETTENBURGER, K., SILLABER, C., VALENT, P., BETTELHEIM, P.,
BREITENBACH, M., RUMPOLD, H., KRAFT, D., SCHEINER, O. (1991):
Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized individuals.
Science, 253, 557-560.
11. VALENTA, R., DUCHÊNE, M., EBNER, Ch., VALENT, P., SILLABER, Ch., DEVILLER, P., FERREIRA, F., TEJKL, M.,
EDELMANN, H., KRAFT, D., SCHEINER, O. (1992):
Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens.
J. Exp. Med. 175, 377-385.

Korrespondenzadresse Mag. Andreas Obwaller
Abteilung für Medizinische Parasitologie
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1998

Band/Volume: [20](#)

Autor(en)/Author(s): Obwaller A., Duchene [Duchéne] Michael, Auer H., Kraft D., Aspöck Horst

Artikel/Article: [Extraktion und Identifizierung von Profilin, einem IgE-reaktiven Antigen, aus *Ascaris suum* 37-42](#)