

Aus der  
Universitäts-Hautklinik Tübingen

Nod-like Rezeptoren und Interleukin-1 Zytokine in basophilen  
und eosinophilen Granulozyten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Schlögl, Alexandra

2019



Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Yazdi  
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein

Tag der Disputation: 09.05.2019

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

## INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG .....	1
1.1 DAS IMMUNSYSTEM.....	1
1.1.1 <i>Das angeborene Immunsystem</i> .....	1
1.1.2 <i>Das erworbene Immunsystem</i> .....	2
1.2 NLR FAMILIE UND DAS INFLAMMASOM .....	3
1.3 INTERLEUKIN-1 FAMILIE .....	5
1.4 BASOPHILE GRANULOZYTEN .....	7
1.5 EOSINOPHILE GRANULOZYTEN.....	9
1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....	11
2. MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 MATERIAL.....	12
2.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	12
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterial</i> .....	15
2.1.3 <i>Geräte</i> .....	15
2.1.4 <i>Kits</i> .....	16
2.2 METHODEN.....	17
2.2.1 <i>Isolation von basophilen und eosinophilen Granulozyten aus humanem Vollblut</i> ... 17	
2.2.1.1 Dichtegradientenzentrifugation.....	17
2.2.1.2 Magnetische Separation der basophilen Granulozyten .....	18
2.2.1.3 Magnetische Separation der eosinophilen Granulozyten .....	20
2.2.2 <i>Stimulation</i> .....	20
2.2.3 <i>RNA Isolation</i> .....	22
2.2.4 <i>cDNA Synthese</i> .....	23
2.2.5 <i>Real time quantitative Polymerase chain reaction (qPCR)</i> .....	24
2.2.6 <i>Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)</i> .....	25
2.2.7 <i>Western Blot</i> .....	26
2.2.8 <i>Immunfluoreszenz-Mikroskopie</i> .....	28
3. ERGEBNISSE.....	30
3.1 NLR-EXPRESSION IN BASOPHILEN GRANULOZYTEN.....	30
3.2 INTERLEUKIN-1 FAMILIENMITGLIEDER IN BASOPHILEN GRANULOZYTEN .....	31
3.3 IL-33 UND ST2 REZEPTOR IN BASOPHILEN GRANULOZYTEN.....	32

## Inhaltsverzeichnis

3.4	ZYTOKINSEKRETION BASOPHILER GRANULOZYTEN .....	34
3.5	ERGEBNISSE WESTERN BLOT .....	35
3.6	IL-33 NACHWEIS MITTELS IMMUNFLUORESZENZ IN BASOPHILEN GRANULOZYTEN 38	
3.7	NLRs IN EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN.....	40
3.8	INTERLEUKIN 1-ZYTOKINE IN EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN .....	42
3.9	IL-33 UND ST2 IN EOSINOPHILEN GRANULOZYTEN .....	43
4.	DISKUSSION.....	45
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	52
6.	ABBILDUNGEN UND TABELLEN .....	54
6.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	54
6.2	TABELLENVERZEICHNIS .....	56
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	57
8.	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT .....	61
9.	DANKSAGUNG .....	62
10.	LEBENS LAUF.....	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>

## Abkürzungsverzeichnis

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIM2	absent in melanoma
APC	Antigen-Präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	apoptosis associated speck-like protein containing a CARD
B	Basophile Granulozyten
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	Caspase-Rekrutierungs Einheit
CCL	chemokine ligand
COPD	chronische obstruktive Lungenerkrankung
CTL	C-Typ Lectins
DAMP	danger-associated molecular pattern
DNA	deoxyribonucleic acid
E	Eosinophile Granulozyten
ECP	Eosinophiles kationischen Protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Eosinophile Peroxidase
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony stimulating factor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	interferon regulation factor
LLR	leucin-rich-repeat Domäne
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPK	mitogen activated protein kinase
MBP	major basic protein
MDP	muramyl dipeptide
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
NACHT	Nukleotid-bindende und oligomerisierende Domäne
NF-κB	nuclear factor κB
NLR	Nod-like Rezeptoren

## Abkürzungsverzeichnis

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGN	bacterial peptidoglycan
PRR	Pattern-Recognition Rezeptoren
PYD	Pyrin-Domäne
RIG	RIG-I-like Rezeptoren
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TLR	Toll-like Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor



# Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen hat die primäre Funktion, den Körper vor krankheitserregenden Noxen zu schützen und körpereigene von körperfremden Zellen und Substanzen zu unterscheiden [1]. Dazu wird es in einen „innaten“, angeborenen Teil und einen „adaptiven“, erworbenen Teil untergliedert. Zum angeborenen Immunsystem werden neutrophile, eosinophile, basophile Granulozyten, Monozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen sowie das Komplementsystem gezählt. Zum adaptiven Immunsystem gehören B- und T-Lymphozyten.

#### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem erkennt Erreger sofort, ohne zuvor mit ihnen in Kontakt gewesen zu sein. Es stellt die schnellste Reaktion dar. Wichtig dabei ist, eine Struktur als „fremd“ zu erkennen. Dieses Strukturmuster wird als PAMP (pathogen-associated molecular pattern) oder DAMP (danger-associated molecular pattern) bei nicht mikrobiellen Noxen bezeichnet. Dazu zählen beispielsweise Zellwand- und Zellmembranbestandteile (z. B. Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien oder die Peptidoglykane grampositiver Bakterien), Hitzestress-Proteine und virale Nukleinsäuren [2]. Neben den PAMPs werden auch DAMPs erkannt, die entweder exogen zugeführt werden oder endogen von geschädigten Zellen freigesetzt werden [3]. Diese PAMPs und DAMPs werden von Pattern-Recognition Rezeptoren (PRR) erkannt, welche auf den Zellen des unspezifischen Immunsystems vorkommen und so für die Auslösung einer Immunantwort verantwortlich sind. Die PRRs werden in Untergruppen eingeteilt. Die wichtigsten sind die Oberflächen-PRRs und die intrazellulären PRRs. Zu den Oberflächen-PRRs zählen die Toll-like Rezeptoren (TLR) und die C-Typ Lectins (CTL), welche entweder an der Zellmembran oder in den Endosomen lokalisiert

## Einleitung

sind [1, 4]. Im Gegensatz dazu überwachen die intrazellulären PRRs wie z. B. die Nod-like Rezeptoren (NLR) und RIG-I-like Rezeptoren (RIG) das Zytoplasma [5]. Die NLRs erkennen vor allem Oberflächenmoleküle von Bakterien, während RIGs vor allem virale Doppelstrang-RNA (ribonucleic acid) detektieren. Natürliche Killerzellen sind ebenfalls ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems und dienen unter anderem der Erkennung von Zellen, die von einem Virus befallen wurden und dadurch ein differentes Oberflächenmuster aufweisen [6]. Trotz unterschiedlicher Rezeptoren konvergieren die Signalwege auf einer gemeinsamen Ebene, die häufig mit einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dem AP-1 Transkriptionsfaktor einhergehen. Die dadurch gesteigerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie des Transkriptionsfaktors IRF (interferon regulation factor) induzieren eine Entzündungsreaktion, z.B. durch Ausschüttung von Typ-1-Interferonen oder anderen proinflammatorischen Zytokinen [7, 8].

Alle diese Mediatoren haben das Ziel, Immunzellen zu rekrutieren, um das angeborene Immunsystem und schließlich auch das adaptive Immunsystem zu aktivieren [9].

### 1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem reagiert im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem mit einer spezifischen Reaktion auf die auslösende Substanz. An dieser spezifischen Reaktion sind vor allem B- und T-Lymphozyten beteiligt, wobei die B-Lymphozyten und die aus ihnen hervorgehenden Plasmazellen für die humorale Antwort und die T-Lymphozyten für die zelluläre Antwort zuständig sind. Eine sehr wichtige Rolle spielt dabei die Dendritische Zelle als Antigen-präsentierende Zelle [10]. B-Zellen können dabei direkt über ihren B-Zell-Rezeptor native Antigene erkennen. Die T-Lymphozyten können ein Antigen nicht direkt erkennen, sondern benötigen eine Antigen-Präsentierende Zelle (APC) wie die Dendritische Zelle, welche das Antigen prozessiert und der T-Zelle auf seiner Oberfläche präsentiert. Der auf der T-Zelle lokalisierte T-Zell-Rezeptor (TCR)

## Einleitung

erkennt Fragmente des Antigens, die ihm über den Major-Histocompatibility-Complex (MHC) der APC präsentiert werden.

Alle kernhaltigen, körpereigenen Zellen tragen MHC Klasse-I Proteine auf ihrer Oberfläche. Intrazelluläre Antigene werden von APC in Peptide zerlegt und diese Peptide über das MHC Klasse I Molekül an der Oberfläche präsentiert, welches dann von CTLs erkannt wird. Über diesen Mechanismus kann die CTL die erkannte Zelle durch Ausschüttung von zytotoxischen Mediatoren direkt abtöten. Im Gegensatz dazu werden extrazelluläre Antigene von APC über Endozytose aufgenommen, prozessiert und meist über MHC Klasse II den T-Helferzellen präsentiert, wodurch anschließend ein immunologischer Effekt ausgelöst wird.

### 1.2 NLR Familie und das Inflammasom

Die humane Nod-Like-Rezeptor (NLR) Familie besteht aus 22 Proteinen, die eine Multiproteindomäne mit einer dreigliedrigen Architektur tragen. Zentral gelegen ist eine Nukleotid-bindende und oligomerisierende Domäne (NACHT), welche am C-terminalen Ende meist eine leucin-rich-repeat Domäne (LRR) besitzt und am N-terminalen Ende entweder eine Caspase-Rekrutierungs Einheit (CARD) oder Pyrin-Domäne (PYD) trägt. Die LRR-Domäne dient vermutlich als Sensor für den Liganden und kann durch die Faltung autoregulatorisch agieren. Daneben sind die CARD- und PYD-Domäne für Protein-Protein Interaktionen und supprimierende Signale verantwortlich. Die NACHT-Domäne ist als einzige Domäne allen NLRs gemeinsam. Phylogenetisch wurde die NLR-Familie in drei Subfamilien aufgeteilt: Die Nod-Subfamilie, die NLRP-Subfamilie und die IPAF-Subfamilie, welche IPAF und NAIP enthält [4].

NLRs sind nicht nur das zytosolische Pendant zu TLRs, sondern sie besitzen noch weitere Funktionen wie Suppression und Modulation der Entzündung [11]. Dabei können die meisten NLRs einer von vier funktionellen Gruppen zugeteilt werden: Bildung eines Inflammasoms, Aktivatoren von nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und mitogen activated protein kinase (MAPK), Inhibitoren des inflammatorischen Signalwegs sowie Transaktivatoren der MHC Expression [12].

## Einleitung

Der Begriff Inflammasom setzt sich zusammen aus dem Wort Inflammation für Entzündung und dem Suffix „som“ vom altgriechischen soma „Körper“. Dieses Suffix wird in der Zellbiologie sehr häufig für Entitäten oder Molekülkomplexe wie z. B. Liposom, Ribosom oder Proteasom verwendet. Das Inflammasom stellt eine Plattform da, welche bei Infektion oder Stress einer Zelle aktiviert wird und durch die Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-1 $\beta$  an der angeborenen Immunabwehr beteiligt ist.

Das Inflammasom besteht aus einem Nod-like Rezeptor oder dem HIN-200-Protein (Absent in Melanoma) AIM2, einem Adaptermolekül bekannt als ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain (CARD)) und einem Effektormolekül Caspase-1 [4, 13]. Die vier am besten untersuchten Inflammasome sind NLRP1, NLRP3, NLRC4 (IPAF) und AIM2. NLRPs besitzen neben dem NLR eine Pyrin Domäne, während NLRC über eine Caspase Rekrutierungseinheit verfügt. AIM2 kann als nicht NLR ebenfalls Inflammasomen bilden [4]. Durch Dangersignale, wie zum Beispiel Infektionen oder sterile Noxen, werden die unterschiedlichen Inflammasomen noxenspezifisch aktiviert. Die Aufgabe der Inflammasomen ist die proteolytische Aktivierung pro-inflammatorischer Caspasen, wie Caspase-1. Aktive Caspase-1 kann anschließend Interleukin-1 $\beta$  aus seiner inaktiven Vorstufe in seine aktive Form verwandeln.

Im Unterschied zu NLRP3 besitzt NLRP1 am C-terminalen Ende eine CARD-Domäne, welche direkt mit Procaspase-1 interagiert und so das Adaptermolekül ASC nicht benötigt. Außerdem interagiert NLRP1 nicht nur mit Caspase-1, sondern auch mit Caspase-5, welche wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Prozessierung von IL-1 $\beta$  spielt [14].

Auch NLRC4/ IPAF kann über eine CARD-Domäne direkt an Procaspase-1 binden. Das Adaptermolekül wird allerdings nur benötigt, wenn es zu einer maximalen Aktivierung des Inflammasoms, z. B. durch *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* oder *Pseudomonas aeruginosa*, kommt. Welche Rolle ASC dabei übernimmt ist aber noch immer unklar [15], vermutet wird, dass eine durch IPAF induzierte Caspase-1 Aktivität mit einem schnellen Zelltod assoziiert ist [16].

## Einleitung

Weitere NLR-Familien sind die NF- $\kappa$ B- und MAP-Kinase aktivierenden NLRs. Dazu zählen die Nucleotide oligomerisierende Domänen 1 und 2 (NOD1 und NOD2). Das Molekül ist nach einem ähnlichen Schema wie die NLRs aufgebaut, mit einer zentralen NOD-Domäne, einer C-terminalen LRR Domäne und einer bzw. zwei CARD-Domänen [12]. NOD1 und NOD2 kommen im Zytosol verschiedener Zellen vor und erkennen bacterial peptidoglycan (PGN) Fragmente wie z.B. muramyl dipeptide (MDP). Durch das Erkennen solcher Strukturen kommt es über CARD-CARD Interaktion zu einer Rekrutierung der Kinase RIP2 und einer anschließenden Oligomerisation. Daraus resultiert eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B [17, 18]. Dieser Transkriptionsfaktor transloziert anschließend in den Kern der Zelle, um dort an unterschiedlichen Promotern anzugreifen, welche für wichtige Gene im Zusammenhang mit Entzündungen stehen. Ein Beispiel dafür sind Interleukin 8 und COX-2.

Die intrazellulären und extrazellulären, beziehungsweise endosomalen PRRs können so im Rahmen einer Gefahrensituation die Noxe detektieren, um dann eine synergistische Immunantwort zu evozieren, die schließlich sowohl das angeborene, als auch das erworbene Immunsystem aktiviert.

### 1.3 Interleukin-1 Familie

Zur Interleukin-1 Familie gehören sieben pro-inflammatorische (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  und IL-36 $\gamma$ ) und vier anti-inflammatorische Interleukine (IL-1R Antagonist (IL-1Ra), IL-36Ra, IL-37 und IL-38) [19]. Alle codierenden Gene für die Interleukin-1 Familie (außer IL-18 und IL-33) liegen auf Chromosom 2 [20, 21]. Die Produktion der Zytokine findet im Zytoplasma statt. Die Sekretion verläuft über einen endoplasmatischen Retikulum-Golgi unabhängigen Mechanismus, da ihnen ein Signalpeptid fehlt. Nur IL-1Ra bildet hiervon eine Ausnahme und wird konventionell sezerniert. Wie der genaue Mechanismus der Ausschüttung der anderen IL-1 Familienmitglieder verläuft, ist noch immer nicht genau bekannt [22]. Bekannt jedoch ist, dass IL-1 $\beta$  und IL-18 als inaktives Vorläufer-Zytokin produziert werden. Um diese in eine aktive Form zu überführen, werden die oben

## Einleitung

beschriebenen Inflammasomen benötigt [14]. Im Gegensatz dazu liegt IL-1 $\alpha$  schon in einer aktiven Form vor. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  haben gemein, dass sie ähnliche biologische Eigenschaften besitzen und an den gleichen Rezeptor (IL-1R1) binden. IL-1 $\alpha$  ist auf allen Epithelien des Gastrointestinaltrakts, der Lunge, der Leber, der Haut, der Niere und Astrozyten exprimiert. Wenn es in diesen Geweben zu einer Nekrose kommt, wird IL-1 $\alpha$  sezerniert und führt sehr schnell zu einer Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Diese führen zur frühen Phase der sterilen Inflammation [23]. Im Gegensatz dazu wird IL-1 $\beta$  von hämatopoetischen Zellen wie z. B. Monozyten oder Makrophagen gebildet und kann systemisch im Körper zirkulieren [24].

Binden IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  an die Liganden-Bindungskette von IL-1R1, wird der Korezeptor IL-1RAcP rekrutiert. Dieser Komplex aus Ligand, Rezeptor und Korezeptor benötigt das Adapter-Protein MyD88, um sich mit dem Toll-like 1 Rezeptor (TIR) zu verbinden und so ein Signal zu übertragen. Als Folge werden nun Kinasen phosphoryliert, NF- $\kappa$ B transloziert in den Nucleus und eine Vielzahl inflammatorischer Gene werden induziert [25].

Ein weiteres bisher weniger charakterisiertes Mitglied der Interleukin-1 Familie ist IL-33. Seine Bedeutung wurde bisher überwiegend bei T<sub>H</sub>-2 Zellen vermittelten Immunantworten vermutet [7, 8, 26]. Glatte Muskelzellen verschiedener Gewebe sowie Bronchial- und Atemwegsepithelien, aber auch dermale Fibroblasten und Keratinozyten verfügen über IL-33 mRNA. Hämatopoetische Zellen, in denen IL-33 in Form von mRNA bis jetzt nachgewiesen werden konnte, sind Dendritische Zellen, Makrophagen [27] und Mastzellen [28]. Strukturell besitzt IL-33 am N-terminalen Ende ein Helix-Turn-Helix Motiv, welches typisch für DNA (deoxyribonucleic acid) bindende Proteine ist. Dieses Motiv kann mit dem Histon 2A und 2B im Heterochromatin interagieren, und so als Transkriptionsrepressor agieren [29]. Anders als IL-1 $\beta$  und IL-18 erfährt IL-33 keine Aktivierung durch Caspase 1, sondern wird durch diese vermutlich sogar inaktiviert [30]. In seiner aktiven Form mit ca. 30 kDa kann IL-33 an seinen Rezeptor IL-1RL1 (auch ST2 genannt) binden. ST2 war lange als selektiver Marker für T<sub>H</sub>-2 Zellen beschrieben,

## Einleitung

wird aber auch auf der Zelloberfläche von Mastzellen sowie auf anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Zudem kann dieser Rezeptor in löslicher Form in Fibroblasten vorliegen. Bindet IL-33 an den membrangebundenen ST2 Rezeptor, wird ein akzessorischer Rezeptor IL-1RAcP benötigt, welcher dann zusammen mit ST2 eine Heterodimerisierung durchlebt. Anschließend erfolgt analog zu IL-1R1 über den intrazellulären Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) eine Aktivierung der NF- $\kappa$ B und MAPK Signalweges [31, 32]. Wird IL-33 im Gegensatz dazu von dem löslichen ST2 Rezeptor und dem löslichen IL-1RAcP Co-Rezeptor gebunden, so wird die Aktivität von IL-33 inhibiert. Die beiden unterschiedlichen Formen des ST2 Rezeptors gehen aus der gleichen m-RNA hervor und entstehen durch alternatives Splicing [33].

IL-33 kann T<sub>H</sub>-2 Helferzellen aktivieren und rekrutieren. Die Bindung an ST2 führt zu der Produktion von T<sub>H</sub>-2 Zytokinen. Werden T<sub>H</sub>-2 Zellen [27] in vitro mit IL-33 inkubiert, konnte eine erhöhte Produktion der T<sub>H</sub>-2-assoziierten Zytokine IL-5 und IL-13 gezeigt werden. T<sub>H</sub>-1 Zellen dagegen konnten durch IL-33 nicht zu einer erhöhten Produktion von IL-5 und IL-13 gebracht werden, die INF $\gamma$  Produktion wurde sogar reduziert [27].

### 1.4 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten wurden erstmals im Jahre 1879 durch ihren Entdecker Paul Ehrlich beschrieben [34]. Dieser hatte ein Jahr zuvor schon eine morphologisch ähnliche Zellpopulation entdeckt, die er Mastzelle nannte [35]. Die Namensgebung rührt von der basophilen Anfärbbarkeit der Granula, in denen z.B. Histamin und Leukotrien C<sub>4</sub> [36] gespeichert sind. Die Zelle ist rund bis oval, besitzt einen gelappten Kern mit kompaktem Chromatin und viele unterschiedlich große Granula im Zytoplasma (Abbildung 1).

## Einleitung

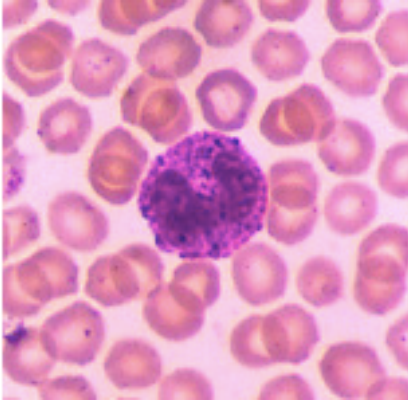


Abbildung 1: Humaner basophiler Granulozyt mit unterschiedlichen Granula (Quelle: Website: <http://www2.nau.edu/~fpm/immunology/blood.html> benutzt am 13.11.2017 [37])

Unter allen kernhaltigen peripheren Blutzellen liegt der Anteil der basophilen Granulozyten bei weniger als 1 %. Daher wurden Basophile lange nicht beachtet und erforscht, sondern sogar oft als „zirkulierende Mastzellen“ betrachtet [36]. Die Ähnlichkeit von basophilen Zellen und Mastzellen ist nicht nur auf ihr Äußeres beschränkt, auch gehen sie wie andere Zellen z. B. Monozyten, Eosinophile und Neutrophile aus der gleichen multipotenten  $CD34^+$  Vorläuferzelle hervor. Basophile reifen im Knochenmark zu vollständigen Zellen heran, Mastzellen dagegen verlassen das Knochenmark als bipotente  $kit^+ CD34^+ CD13^+ Fc\epsilon RI^-$  Zelle und differenzieren erst im Gewebe zu reifen Mastzellen [38-41].

Ein Oberflächenrezeptor, der die basophilen Granulozyten charakterisiert, ist der hoch affine Immunglobulin E (IgE) Rezeptor  $Fc\epsilon RI$  [42]. Durch Andocken eines Antigens, gebunden an IgE, bildet er einen stabilen Komplex und löst damit eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zur Ausschüttung der Granula und Mediatoren führt. Die dabei ausgeschütteten Stoffe können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden [43]: In die Gruppe der Mediatoren, die in Granula gespeichert werden, wie z. B. Histamin, Proteasen und Peroxidasen; in die Gruppe der frei im Zytoplasma vorliegende Lipidmediatoren (v.a. Leukotrien  $C_4$ ) und in die Gruppe der Zytokine, wie z. B. IL-4 und IL-13. Durch die Ausschüttung dieser regulatorischen Zytokine wird Basophilen eine wichtige Rolle bei der  $T_H-2$  Antwort sowie in der Spätphase allergischer Reaktionen [44] zuteil. Aber nicht nur durch Antigene können basophile Granulozyten zur Produktion dieser Zytokine



## Einleitung

angeregt werden. Neuere Studien zeigen, dass auch das Interleukin IL-33 auf die Zelle einwirken kann, denn auf deren Zelloberfläche wird der IL-33 Rezeptor (ST2) exprimiert [45].

### 1.5 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten wurden erstmals von Heinrich Caro im Jahr 1874 beschrieben und fünf Jahre später von Paul Ehrlich als eosinophile Granulozyten benannt [46]. Der Name beruht auf der Eigenschaft, dass sich die Granula durch den Farbstoff Eosin anfärben lassen [47]. Mit nur 1-4 % aller zirkulierenden Leukozyten stellt der eosinophile Granulozyt nur eine kleine Population dar. Charakteristisch sind der gelappte Kern sowie viele rötlich angefärbte acidophile Granula (Abbildung 2).

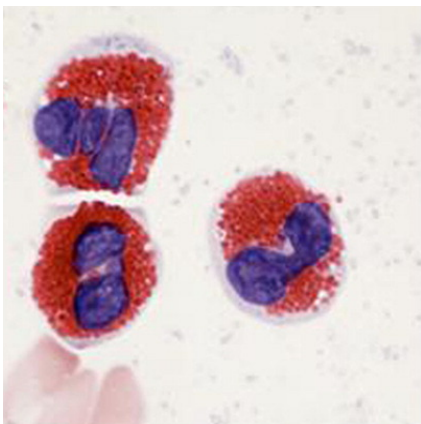


Abbildung 2: Humane eosinophile Granulozyten aus peripherem Blut. Gefärbt mit einem modifizierten Giemsa Farbstoff (Dade Behring AG, Duding, Switzerland). Bild entnommen von Courtesy of Drs Kimberly D. Dyer and Jennifer M. Moser, Laboratory of Allergic Diseases, NIAID [48].

Diese Granula können in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: Kristalloide Granula, primäre Granula, kleine Granula und sekretorische Vesikel. Die größte Bedeutung hat dabei die Gruppe der kristalloiden Granula, auch sekundäre Granula genannt. Sie enthalten vier stark basische Proteine (*highly basic proteins*): major basic protein (MBP), Eosinophile Peroxidase (EPO), Eosinophiles kationischen Protein (ECP) und das von Eosinophilen abgeleitete Neurotoxin

## Einleitung

(EDN) [49]. Durch diese Proteine sind eosinophile Granulozyten bei der Parasitenabwehr, bei allergischen Reaktionen sowie für immunregulatorische Prozesse von Bedeutung. Bei der Freisetzung dieser Stoffe kommt es zu zytotoxischen Effekten im umgebenden Gewebe [50]. Neben diesen Proteinen enthalten die Granula noch weitere wichtige Mediatoren wie IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-25, Tumornekrosefaktor (TNF), Transformierender Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF  $\alpha/\beta$ ), CCL5 und CCL11/ 13. Eosinophile und basophile Granulozyten gehen aus der identischen oligopotenten myeloischen Vorläuferzelle hervor. Sie entwickeln sich aus der CD34<sup>+</sup> Stammzelle des Knochenmarkes unter Einfluss von granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) sowie IL-3 und IL-5 [48]. IL-3 und GM-CSF werden in der frühen Differenzierungsphase benötigt, IL-5 dagegen in der späteren sowie zur Freisetzung aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut. Eosinophile Granulozyten kommen bevorzugt neben dem Knochenmark im Gastrointestinaltrakt vor [51]. Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten üben eosinophile Granulozyten ihre funktionelle Bedeutung im Gewebe aus, so auch im Endothel der Bronchien bei Asthma bronchiale, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) oder anderen chronischen Lungenerkrankungen [52]. Um die zirkulierenden Zellen aus der Blutbahn in das Gewebe zu locken, sind wichtige Botenstoffe wie das Prostaglandin D2 (PGD<sub>2</sub>) notwendig [53]. PGD<sub>2</sub> wird durch IgE aktivierte Mastzellen ausgeschüttet [54].

Eine weitere Gemeinsamkeit von basophilen und eosinophilen Granulozyten ist der hochaffine IgE Oberflächenrezeptor Fc $\epsilon$ RI [48]. Neben dem bereits erwähnten IgE Rezeptor tragen beide Zelltypen ST2 als Rezeptor für IL-33 [55, 56]. In mehreren Studien wurde bereits der Effekt von IL-33 auf die eosinophilen Granulozyten und die Bedeutung während der Anfangsphase einer allergischen Reaktion im peripheren Gewebe gezeigt [57].

## Einleitung

### 1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Nod-like Rezeptoren und IL-1 Zytokine sind wichtige Vertreter der angeborenen Immunität. Deren Expression und Funktion in Makrophagen, Dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten wurde ausführlich untersucht. Da einzelne NLRs und IL-33 als IL-1 Familienmitglied mit einer T Helfer Zell ( $T_H$ ) 2 Antwort assoziiert werden, ist Ziel dieser Arbeit, die Expression und Funktion der Immunrezeptoren und Zytokine in basophilen und eosinophilen Granulozyten zu untersuchen.

## Material und Methoden

### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Material

##### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
SYBR-green qPCR Master Mix	Roche
q-PCR Mastermix	Roche
Easycoll, Dichte 1,077 G/ML	Biochrom AG
PBS, phosphate buffered saline	Sigma-Aldrich
Tween-20	Merck
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec
Ziegenserum	Dako Denmark
Poly-L-Ornithin (0,01%)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom AG
LPS	Sigma-Aldrich
Imiquimod	InvivoGen
IL-33, Antibody (PA5-20397)	ThermoFischer
IL-33, Antibody ELISA	AdipoGen, Anti-IL-33, mAb (Il33068A)
IL-33 antibody	Biorbty, Catalog Number: orb 88396 <a href="https://www.biorbyt.com/il-33-antibody-orb88396.html">https://www.biorbyt.com/il-33-antibody-orb88396.html</a>
Sekundärantikörper, Anti Rabbit	Alexa Fluor 594
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Thermo Fischer
Hoechst 33342	Thermo Fischer
FCR = Anti- Human Fc epsilon Receptor	Affymetrix e Bioscience Catalog Number: 14-5899
X-Vivo 15	Lonza
Triton X-100 0,5%	Carl Roth
NaF 0,5 M	Sigma-Aldrich
Urea 6M	Sigma-Aldrich

## Material und Methoden

Complete Protease Inhibitor	Roche
EDTA 0,5 M	Sigma-Aldrich
Dichlordiphenyltrichlorethan	Sigma-Aldrich®
Glycin	Sigma-Aldrich®
Glycerin	Sigma-Aldrich®
Tetramethylethylenediamine	Thermo Fischer
Ammonium Persulfate	Thermo Fischer
Natriumlaurylsulfat	Bio Chem
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich®
Roti-Quant	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Page Ruler	Western Blot, Thermo Fischer
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich®
Magic Marker	Western Blot, Thermo Fischer
Moviol	Sigma-Aldrich®
Ethanol	Merck
Tryptanblau	Gibco
Complete Protease Inhibitor	Roche
IL-3 , c=10 ng/ml	(Novartis, Basel, Switzerland) <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12309/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12309/full</a>
IL-33, c= 100 ng/ml	(Alexis Lausen, Switzerland) <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12309/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12309/full</a>
ASC Western Blot AK	anti-Asc (AL177) von AdipoGen, AG-25B-0006
Caspase 1 Western Blot AK	Caspase-1 (D7F10), Cell Signaling, 3866S
Aktin Western Blot AK	Anti-Actin, Merck Millipore, MAB1501R

*Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien*

## Material und Methoden

PBS-T	0,1 %	Tween-20	500µl
		PBS	500ml
Western Blot-Lyse Puffer:	1mM	EDTA 0,5 M Stocklösung	100µl
	0,005%	Tween-20	2,5µl
	0,5%	Triton X-100	250µl
	5 mM	NaF 0,5 M Stocklösung	500µl
	6 M	Urea	18g
		dH <sub>2</sub> O	50ml
10 ml werden mit einer Tablette Complete Protease Inhibitior (Roche) versetzt			
SDS-Proben-Puffer:	10%	Glycerin	1ml
	100mM	Dichlordiphenyltrichlorethan	0,7g
	2%	Natriumlaurylsulfat	0,2g
	0,01%	Bromphenolblau	0,001g
	125mM	Tris-HCl pH 6,8	2,5ml
	dH <sub>2</sub> O	10ml	
SDS-Laufpuffer:	250mM	Tris	30g
	2M	Glycin	144g
	1%	Natriumlaurylsulfat	10g
		dH <sub>2</sub> O	1000ml
Sammelgel-Puffer:	0,5M	Tris	6,06g
	0,4%	Natriumlaurylsulfat	4ml
		dH <sub>2</sub> O	100ml
Trenngel-Puffer:	1,5 M	Tris	18,17g
	0,4%	Natriumlaurylsulfat	4ml
		dH <sub>2</sub> O	100ml

*Tabelle 2: Pufferlösungen*

## Material und Methoden

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
S-Monovette® EDTA 9ml	Intermed
Safety-Multifly® 21G, 200mm lang	Sarsted
Neubauer Zählkammer	Nano EnTek
24 Well Platte	Corning
RT-PCR Platte, 96 Well	Biozym
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf
50 ml Falcon	Greiner
Zellkultur Schalen	Greiner
SafeSeal Tips	Biozym

*Tabelle 3: Material*

### 2.1.3 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Nanodrop Spectrophotometer	Thermo Scientific
Light Cycler 480 PCR Maschine	Roche
Mikroskop	Leica DMI L
Centrifuge, Multifuge 3	Heraeus
Zentrifuge Heraeus Fresco 16	Thermo Scientific
Biofuge fresco	Heraeus
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Odyssey Western Blot	Li-Cor
Pipetten, 1µl bis 1000µl	Eppendorf
Wärmeschrank	Hera Cell 240
Rocker 25	Labnet International
Western Blot Protein Transfer Kammer	Biostep® GmbH

## Material und Methoden

Mikroskop Axiovert 2000	Zeiss
Western Blot Odyssey	Li-Cor
ELISA Multiskan EX	Thermo
Waage	Kern EW
Vortexer REAXtop	Heidolph

Tabelle 4: Geräte

### 2.1.4 Kits

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
DyNAmo cDNA Synthesis Kit	Biozym Scientific GmbH
Light Cycler SYBR Green	Roche
peqGOLD Total RNA kit	peqlab
DuoSet ELISA Kits	R&D Systems
Eosinophil Isolation Kit, human	Milteny Biotec
Diamond Basophil Isolation Kit, human	Milteny Biotec

Tabelle 5: Kits



### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Isolation von basophilen und eosinophilen Granulozyten aus humanem Vollblut

Basophile und eosinophile Granulozyten sind Bestandteile der mononukleären Zellen des Blutes. Alle kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes werden als PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) bezeichnet und diese Fraktion wird mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen. Aus der PBMC Fraktion werden anschließend durch magnetische Selektion mit Hilfe der MACS-Kits (Miltenyi Biotec GmbH) die basophilen bzw. eosinophilen Granulozyten purifiziert.

##### 2.2.1.1 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Gewinnung der PBMCs werden dem Probanden 90 ml Vollblut über eine periphere Vene am Arm in 9 ml EDTA-Röhrchen entnommen. Das Blut wird in 50 ml Falcons 1:1 mit Phosphate Buffered Saline (PBS) verdünnt und vorsichtig vermischt. In ein neues steriles 50 ml Falcon werden 15 ml der Ficoll-Lösung (Easycoll) vorgelegt und anschließend darauf das verdünnte Vollblut geschichtet. Dabei ist darauf zu achten, dass sich die Phasen nicht vermischen. Die befüllten Falcons werden anschließend bei Raumtemperatur 20 min lang mit 850 x g und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Dadurch wird das Gemisch ihrer jeweiligen Dichte nach in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt (Abbildung 3). Ganz oben lagert sich mit der geringsten Dichte das verdünnte Blutplasma ab, darunter die PBMC-Fraktion zusammen mit Thrombozyten. Direkt unter den PBMCs befindet sich das Trennmedium und ganz unten im Gefäß sammeln sich hauptsächlich Erythrozyten.

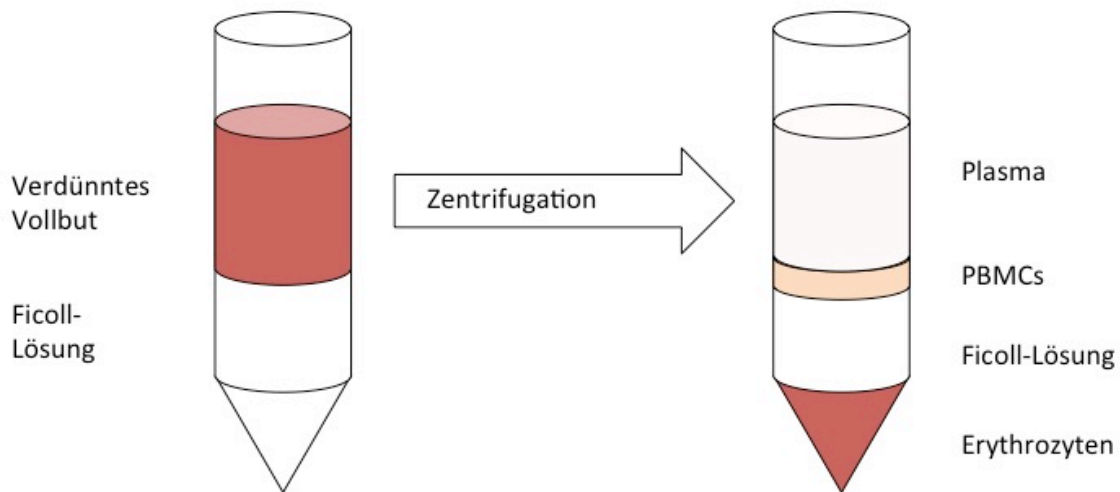


Abbildung 3: PBMC-Isolierung durch Dichtegradientenzentrifugation

Nach der Zentrifugation wird die PBMC-Fraktion vorsichtig mit einer 100  $\mu$ l Pipette abgenommen und jeweils zwei Fraktionen aus zwei 50 ml Falcons in ein neues steriles 50 ml Falcon gegeben und auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Dies entspricht dem ersten Waschgang und wird in der Zentrifuge bei 480 x g für 5 min durchgeführt. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut in 50 ml PBS resuspendiert und einem zweiten Waschgang unterzogen. Für den dritten und letzten Waschgang werden die Überstände erneut verworfen und alle gewonnenen PBMCs in einem 50 ml Falcon vereint, mit MACS-Puffer resuspendiert und das Falcon auf 50 ml aufgefüllt. Der dritte Waschgang wird erneut in der Zentrifuge unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach dem letzten Waschgang wird der Überstand verworfen und eine Bestimmung der Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop durchgeführt.

### 2.2.1.2 Magnetische Separation der basophilen Granulozyten

Basophile Granulozyten werden über magnetische Zellseparation (MACS, magnetic activated cell sorting) mithilfe eines Isolationskits der Firma Miltenyi

## Material und Methoden

Biotec GmbH aufgereinigt. Dabei macht man sich zunutze, dass Zellen unterschiedlicher Populationen verschiedene Oberflächenmarker an ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese Oberflächenmoleküle können mit Antikörpern markiert werden. Im Falle einer magnetischen Zellseparation sind diese Antikörper an paramagnetische Partikel (genannt Beads) gekoppelt. Beim *Diamond Basophil Isolation Kit human* (Miltenyi Biotec GmbH) verwendet man die Negativ-Selektion, sprich die Depletion der Nicht-Basophilen mithilfe magnetischer Antikörper. Zu den Nicht-Basophilen zählen z. B. T-Zellen, Natürliche Killerzellen, B-Zellen, Monozyten, Dendritische Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten. Alle diese Zellen werden durch einen Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA, HLA-DR und CD235a (Glycophorin A) indirekt gekoppelt. Magnetisch werden diese durch Hinzufügen des Anti-Biotin-MicroBeads.

Nach der Zählung der PBMCs (je nach Blutprobe zwischen 3 und  $20 \cdot 10^7$  Zellen/ml) stimmt man die Mengen der Reagenzien auf die Zellzahl ab. Das Zellpellet wird ein letztes Mal in MACS-Puffer resuspendiert, 5 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen.

Das Zellpellet wird in 30  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen MACS-Puffer resuspendiert, mit 30  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen Biotin-Antibody Cocktail gemischt und für 10 Minuten bei 4 °C unter Ausschluss von Licht inkubiert. Dazu wird anschließend 30  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen MACS-Puffer und 20  $\mu$ l pro  $10^7$  Zellen Anti-Biotin-MicroBeads gegeben und erneut bei 4 °C und unter Lichtausschluss für 15 min inkubiert. Der darauffolgende Waschgang mit MACS-Puffer dient dazu, die ungebundenen magnetischen Partikel aus dem Gemisch zu entfernen. Dieser wird bei 300 x g für 10 min in der Zentrifuge durchgeführt. Währenddessen wird die LS-MACS Säule in den Permanentmagneten der Firma Miltenyi Biotec eingespannt und die Säule mit 3 ml gekühltem MACS-Puffer benetzt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand mit den darin gelösten ungebundenen Antikörpern verworfen und das Pellet mit den markierten Zellen und unmarkierten basophilen Granulozyten in 500  $\mu$ l MACS-Puffer suspendiert und auf die eingespannte LS Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 5 ml Puffer werden die basophilen

## Material und Methoden

Granulozyten als Negativ-Selektion im Durchfluss gewonnen. In der Säule zurück bleiben alle magnetisch markierten Zellen (PBMCs ohne basophile Granulozyten). Die positiv selektionierten PBMCs können als Eluat gewonnen werden, indem man die Säule aus dem Magneten entfernt und mit 5 ml Puffer und dem mitgelieferten Stempel aus der Säule löst. Diese Positivselektion kann für weitere Versuche als Kontrolle verwendet werden. Die gewonnenen Zellen werden anschließend mit 480 x g für 10 Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Zellen werden nach der Separation in X-VIVO 15 Medium, welches mit IL-3 in der Konzentration 10 ng/ml angereichert ist, aufgenommen und gezählt.

### 2.2.1.3 Magnetische Separation der eosinophilen Granulozyten

Zur Aufreinigung der eosinophilen Granulozyten wird das *Eosinophil Isolation Kit human*, ein Kit der Firma Miltenyi Biotec GmbH genutzt. Die Separation der eosinophilen Granulozyten erfolgt analog der Isolation basophiler Granulozyten. Die Negativ-Selektion erfolgt durch einen Cocktail aus Biotin-konjugierten Antikörpern von CD2, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a (Glycophorin A).

Der Ablauf der Separation entspricht dem der basophilen Granulozyten. Die Zellen werden nach der Separation in mit IL-3 (c=10 ng/ml) angereichertem X-VIVO 15 Medium aufgenommen und gezählt. Die übrigen PBMCs (Positivselektion) ohne eosinophile Granulozyten werden ebenfalls aus der Säule gewonnen und aufgehoben, um sie für weitere Versuche als Kontrolle zu verwenden.

### 2.2.2 Stimulation

Die aufgereinigten Zellen (basophile bzw. eosinophile Granulozyten) werden nach der Zählung in X-VIVO 15 Medium mit rekombinantem IL-3 (c=10 ng/ml) aufgenommen und in eine 24 Well Platte (Abbildung 4) zu je 250 µl ausplattiert.

## Material und Methoden

Die Zellzahl liegt bei  $1,0 - 3,0 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Als Kontrolle werden die positiv selektionierten PBMCs aus den Versuchen der magnetischen Separation ausplattiert und mit den gleichen Stimulantien inkubiert.

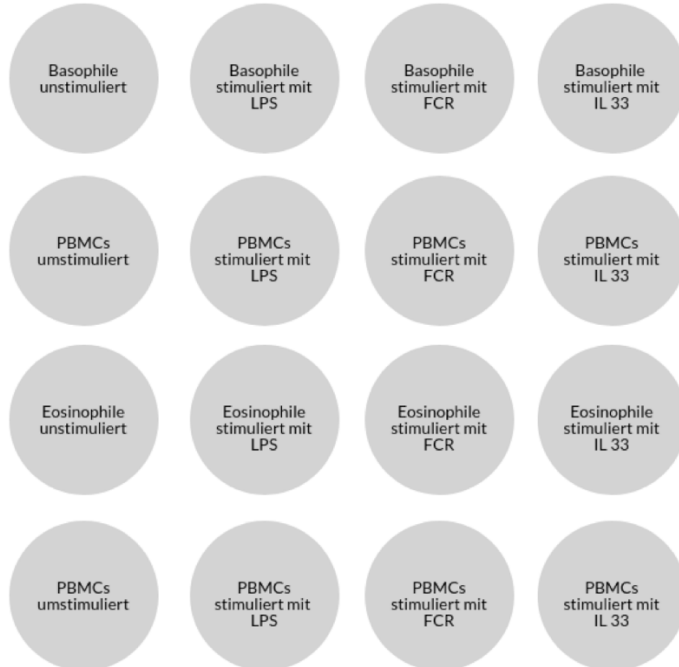


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer 24-Well Platte mit unterschiedlichen Stimulationsbedingungen

Die einzelnen Konditionen werden unterschiedlich behandelt bzw. unterschiedlich stimuliert. Die Stimulation läuft über 12 Stunden und wird mit folgenden Stimulantien [LPS (Sigma-Aldrich), Anti-Human Fc epsilon Receptor (Affymetrix e Bioscience) und IL-33 (ThermoFischer)] und Konzentrationen durchgeführt.

- LPS (c=1 µg/ml)
- anti-FcεRI (=FCR) (c=1 µg/ml)
- IL-33 (c=100 ng/ml)

Nach beendeter Stimulation wird die Platte aus dem Inkubator genommen. Die Zellen setzen sich in der Zwischenzeit am Boden ab, sodass der Überstand mit einer 100 µl Pipette entnommen werden kann. Die adhärennten Zellen werden nach einmaligem Spülen mit PBS in 400 µl RNA-Lysis Buffer (peqGOLD Total RNA Kit, Peqlab) lysiert.

### 2.2.3 RNA Isolation

RNA wird aus den Zellen isoliert, anschließend in cDNA umgeschrieben und dann mithilfe der Real-Time PCR amplifiziert und quantifiziert.

Die in RNA-Lysis Buffer lysierten Zellen werden nach Anleitung des *peqGOLD Total RNA Kits* weiterverarbeitet. Dabei wird darauf geachtet, dass die Proben auf Eis gelagert werden, um die RNase-Aktivität so gering wie möglich zu halten.

Die Proben mit dem zugesetzten RNA-Lysis Buffer werden auf dem Vortexer gut gemischt und anschließend auf die DNA Removing Column gegeben. Das Tube mit der Säule wird anschließend für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert, um die noch vorhandene DNA der Probe an die Säule zu binden und damit zu entfernen. Die Säule wird nach diesem Schritt verworfen und nur der Säulendurchfluss mit der enthaltenen RNA weiterverwendet. In das Collection Tube mit dem Durchfluss gibt man das identische Volumen (400 µl) 70%igen Ethanol und mischt es sorgfältig, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind. Dieses Gemisch wird auf eine neue Säule, die PerfectBind RNA Column, in einem neuen 2 ml Collection Tube gegeben und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. In diesem Schritt bindet die RNA der Probe an die Säule und alle übrigen Partikel verlassen die Säule und werden zusammen mit dem Säulendurchfluss verworfen. Die nun an die Säule gebundene RNA wird durch drei Waschgänge aufgereinigt. Dazu wird das 2 ml Collection Tube gewechselt, 500 µl RNA Wash Buffer I auf die Säule pipettiert und für 15 sec bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wird anschließend verworfen, die Säule und das Tube weiterverwendet. Nun folgen zwei Waschschrte nach dem gleichen Prinzip mit je 600 µl RNA Wash Buffer II. Zum Trocknen der Säule wird diese 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die gebundene RNA wird mit 40 µl RNase-freiem dH<sub>2</sub>O von der Säule durch anschließende Zentrifugation bei 5.000 x g für 1 min eluiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt fotometrisch mittels *NanoDrop*. Dabei wird eine fotometrische Messung mit einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Hierfür gibt man 1 µl der Probe auf das Gerät, welches dann die Absorption bestimmt und so die Konzentration der enthaltenen RNA errechnet.

Zur Bestimmung der Reinheit wurde ein Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280nm errechnet. Dieser lag zwischen 1,9 und 2,2. Bis zur Weiterverarbeitung werden die RNA-Proben bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4 cDNA Synthese

Die nun gewonnene RNA muss in cDNA umgeschrieben werden, um sie für die quantitative Analyse in der Real Time PCR verwenden zu können. Für diesen Vorgang wird das Enzym Reverse Transkriptase M-MuIV RNase H<sup>+</sup> (*DyNAmo cDNA Synthesis Kit for qRT-PCR*, Thermo Scientific) verwendet, welches als RNA-abhängige DNA-Polymerase einen komplementären cDNA-Strang zur RNA erstellt.

Auch hier wird stets auf Eis pipettiert, alle Materialien und Geräte sind frei von RNasen. Die verwendeten Reagenzien sind alle im oben beschriebenen Kit enthalten. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wird mit maximal 250 ng RNA pro Ansatz gearbeitet.

Vorgelegt werden je 10 µl des RT Buffers (bestehend aus dNTPs und MgCl<sub>2</sub>). Dazu wird 1 µl Oligo(dT)-Primer gegeben und darauf 2 µl M-MuIV RNase H<sup>+</sup> Reverse Transkriptase. Die RNase H<sup>+</sup> Aktivität unterstützt durch Abbau der RNA vom RNA / cDNA Hybrid ein besseres Binden der Primer und erhöht damit die Sensitivität. Anschließend wird ein Volumen entsprechend 250 ng RNA pro Versuchsansatz pipettiert, maximal jedoch 7 µl. Sind weniger als 7 µl RNA nötig, wird das Volumen mit RNase-freies H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt.

Beim Hinzufügen der einzelnen Reagenzien muss auf eine gute Durchmischung und exakte Volumina geachtet werden. Im Folgenden werden die Versuchsansätze zuerst für 30 min bei 37 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur wird der Versuch gestartet und anschließend bei 85 °C für 5 min gestoppt. Die nun gewonnene cDNA ist in 20 µl gelöst und dient als Ausgangsmaterial für die

quantitative Real-time PCR. Gelagert werden die Proben bis zur Weiterverwendung bei -20 °C.

### 2.2.5 Real time quantitative Polymerase chain reaction (qPCR)

Die real time RT-PCR dient zur Replikation bestimmter Gene mithilfe spezifischer Primer. Der ganze Zyklus wird mit dem Gerät *Light Cycler 480 PCR* der Firma Roche durchgeführt, wobei mit hohen Temperaturen gearbeitet wird, weshalb thermostabile Polymerasen zum Einsatz kommen. Zu Beginn werden die Proben auf 94 °C erhitzt, wobei sich die cDNA in ihre beiden Einzelstränge trennt (Denaturierung). Im Folgenden wird die Temperatur gesenkt. Unter diesen Umständen können die Primer an ihre komplementäre Stelle binden (Annealing). Sobald das Temperaturoptimum von 72 °C erreicht wird, beginnen die Polymerasen die Einzelstränge abzulesen und die komplementären Stränge zu erstellen (Elongation). Diese aufeinanderfolgenden Temperaturänderungen werden ein Vielfaches wiederholt, wodurch in jedem neuen Zyklus ein bestimmtes Gen gebildet wird. Die Vermehrung verläuft exponentiell.

Bei der Herstellung des Ansatzes wird in einer 96-Well-Platte gearbeitet. Es wird auf saubere Gerätschaften und Handschuhe geachtet. Alle Proben und Reagenzien werden auf Eis gelagert. Für jeden Primer werden Doppelwerte sowie eine Wasserprobe als Negativkontrolle mitgeführt.

Die qPCR wird mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt. Für IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-33 und ST2 wird mit TaqMan-Sonden und Primern der Firma *TIB MOLBIOL* gearbeitet. Für NLRP1, NLRP3, NOD1, NOD2, IPAF, Caspase und ASC werden Primer von *Eurofins Genomics* und der DNA-Farbstoff *SYBR Green I* der Firma *Roche* verwendet.

Pro Ansatz wird bei dem sondenbasierten System 5  $\mu$ l Probes Master, 2,5  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser, 0,5  $\mu$ l Forward Primer, 0,5  $\mu$ l Reverse Primer und 0,5  $\mu$ l Sonde vorgelegt und 1  $\mu$ l cDNA Probe in ein Well pipettiert.



## Material und Methoden

Pro Ansatz bei SYBR Green wird 5 µl SYBR Green 1 Mastermix, 2 µl Nuklease freies Wasser und je 1 µl Forward und Reverse Primer vorgelegt und anschließend 1 µl Probe in ein Well gegeben.

Anschließend wird die 96-Well-Platte mit einer Folie versiegelt und für 3 Minuten bei 4 °C und 480 x g zentrifugiert. Die RT-PCR wird im *Lightcycler* maschinell gestartet.

### 2.2.6 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA steht für „Enzyme linked immunosorbent assay“. Im Gegensatz zur qRT-PCR, welche die Transkription und den RNA-Gehalt zeigt, werden im ELISA sezernierte Proteine quantifiziert. Untersucht werden die Sekretion von IL-1 $\alpha$  und IL-33 durch basophile Granulozyten. Dazu werden lysierte Zellen untersucht, um intrazellulär produzierte, aber nicht sezernierte Proteine zu detektieren und deren Überstände, zur Detektion sezernerter Proteine.

Beim Sandwich-ELISA koppelt ein „Coating“ Antikörper an die Platte und gleichzeitig an die zu messende Probe. Bei dieser Kopplung bindet der Detection-Antikörper an das gebundene Substrat, der durch eine fotometrische Reaktion visualisiert wird. Die Stärke der Farbreaktion wird mit einer standardisierten Farbreihe verglichen und so der Proteingehalt der Probe bestimmt.

Der ELISA wird mit den Reagenzien des *DuoSet ELISA Kits (R&D Systems)* nach deren Anleitung durchgeführt.

Am Vortag werden 50 µl Coating Antikörper in eine 96-Well-Platte pipettiert. Sowohl für IL-33 als auch für IL-1 $\alpha$  wird eine extra Platte vorbereitet. In jede Platte wird die Standardreihe im Triplet und die Probe im Duplet pipettiert. Vor jedem der folgenden Schritte erfolgt dreimaliges Waschen mit einer Lösung aus Phosphate Buffered Saline plus Tween (PBS-T). Die Platte mit dem Coating-Antikörper wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich der Coating-Antikörper an

den Boden der Platte setzen kann. Am nächsten Tag werden die Platten zuerst gewaschen, um alle nicht gebundenen Antikörper zu entfernen und anschließend mit 200 µl 1%iger Bovinem Serumalbumin-Lösung (BSA) für eine Stunde geblockt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Nach erneutem Waschen werden 50 µl des Standards bzw. 50 µl der Probe in die Wells pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Aufbringen von 50 µl des Detektion-Antikörpers erfolgt ein erneuter Waschgang und eine erneute Inkubation für zwei Stunden. Anschließend erfolgt jeweils eine zwanzigminütige Inkubation unter Ausschluss von Licht mit 20 µl Streptavidin sowie mit 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat. Die daraus entstehende blaue Farbreaktion, welche proportional zum vorhandenen Analyt ist, wird mit 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Dies zeigt sich in einem Farbumschlag von Blau zu Gelb und die Fluoreszenz wird sogleich fotometrisch bei 450 nm gemessen.

### 2.2.7 Western Blot

Mit Hilfe einer SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Elektrophorese können Proteine in einer Probe nach ihrer Masse und Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Diese Proteine können in einem weiteren Schritt auf eine Membran übertragen werden und unter Zuhilfenahme eines Primär- und Sekundär-Antikörpers mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Zuerst müssen die Zellen lysiert werden. Dazu gibt man die Proben in ein Eppendorf-Gefäß mit Westernblot Lysepuffer und taucht sie anschließend dreimal in flüssigen Stickstoff. Zwischendurch lässt man die Proben vollständig auftauen. Die Proteine liegen nun frei in der Lösung vor und werden durch Zentrifugation von anderem, nicht benötigtem Zellmaterial getrennt. Mit Hilfe des *Roti<sup>®</sup>-Quant Reagenz* (Carl Roth<sup>®</sup>) kann der Proteingehalt der Proben nach Bradford bestimmt werden. Hierzu wird eine standardisierte Konzentrationsreihe mit BSA erstellt und

## Material und Methoden

mit den Proben anhand der Fluoreszenz des Stoffes Coomassie Brilliant Blue-G250 verglichen.

Für die Gelelektrophorese werden ein 5 %iges Sammelgel und ein 12 %iges Trenngel je 1,5 mm dick gegossen. Das Trenngel wird aus 5,0 ml Tris HCl, 8,085 ml Acrylamid, 7,015 ml H<sub>2</sub>O, 0,013 ml Tetramethylethyldiamin (TEMED) und 0,1 ml Ammoniumpersulfat (APS) hergestellt. Das Sammelgel besteht aus 2,08 ml Tris HCl, 1,415 ml Acrylamid, 4,935 ml H<sub>2</sub>O, 0,010 ml TEMED und 0,083 APS.

Von jeder Probe werden 17 µg Protein eingesetzt. Die Proben werden 5:1 mit SDS-Proben-Puffer verdünnt, fünf Minuten bei 95 °C gekocht und anschließend zentrifugiert. Währenddessen werden die Gele in die dafür vorgesehenen Rahmen eingespannt und in die Kammer gesetzt. Diese wird mit Laufpuffer aufgefüllt und die Beladekammern des Gels damit ausgewaschen. Als Marker wird für die Proben *Magic Marker* bzw. *Page Ruler* verwendet. Zum Starten des Vorgangs werden die Gele einem elektrischen Feld ausgesetzt, zuerst für 45 Minuten 80 V und anschließend für 15 Minuten 120 V. Dabei durchlaufen die Proteine zuerst das Sammelgel und trennen sich anschließend im Trenngel auf.

Nach der Auftrennung werden die Gele aus dem Rahmen genommen und für einen nassen Transfer auf die Membran vorbereitet. Dazu wird eine PVDF-Membran zuerst in Methanol aktiviert und anschließend in WB-Puffer getränkt. Der Blot wird für zwei Stunden bei 200 mA transferiert, indem die Membran direkt auf das Gel gelegt wird. Beim anschließenden Blocken wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 10 ml Blocking-Puffer geschwenkt. Der Primärantikörper inkubiert über Nacht in Blocking-Puffer mit PBS-T in der Verdünnung 1:2. Am folgenden Tag wird nach dreimaligem Waschen mit PBS-T der Sekundär-Antikörper hinzugegeben. Dieser Antikörper ist gegen den Ersten gerichtet und mit einem fluoreszierendem Farbstoff gekoppelt. Nach einstündiger Inkubation und anschließendem dreimaligem Waschen kann die Detektion durchgeführt werden. Hierfür wurde die Membran in den Western Blot Odyssey (Li-Cor) eingelegt und mit Hilfe der Software Image Studio<sup>TM</sup> das Fluoreszenzsignal visualisiert und digitalisiert.

### 2.2.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wird zuerst ein Antikörper auf die Zellen gegeben, welcher an die zu detektierende Struktur bindet. In einem zweiten Schritt wird ein mit Farbstoff gekoppelter zweiter Antikörper hinzugegeben, welcher an den ersten Antikörper bindet. In dem folgenden Versuch werden Basophile in Chamberslides kultiviert und stimuliert. Im nächsten Schritt werden die basophilen Granulozyten mithilfe von Immunfluoreszenz gefärbt.

Die Chamberslides werden mit 300 µl Poly-Ornithin in einer 1:10-Verdünnung mit PBS beschichtet und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt wird durchgeführt, um die Oberflächenspannung des Glasträgers zu überwinden, sodass im folgenden Schritt die Zellen mit Medium in die Chambers gegeben werden können. Es werden das gleiche Medium und die gleichen Stimulationsbedingungen wie in den oben beschriebenen Versuchen angewendet, um eine Vergleichbarkeit zu erzielen. Nach der Stimulation wird das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit 2 %igem Formaldehyd für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit PBS-T gewaschen. Nach anschließendem Andauen mit Triton 0,5 %ig für 10 Minuten werden die Zellen erneut dreimal gewaschen. Da der Sekundärantikörper aus der Ziege gewonnen wird, müssen zunächst mit Ziegenserum unspezifische Bindungen für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert werden. Hierzu wird das Ziegenserum in einer 1:20-Verdünnung mit 1 %igem BSA hergestellt. Anschließend wird das Serum verworfen und sofort der Primär-Antikörper gegen IL-33 in einer 1:200-Verdünnung darauf gegeben. Dieser inkubiert für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen wird im nächsten Schritt der zweite Antikörper *Alexa Flour 594* (Goat-anti-rabbit) in einer 1:250 Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht inkubiert. Anschließend folgt, nach dreimaligem Waschen, eine Kernfärbung mit *Hoechst* (1:1200-Verdünnung) und eine Zytoskelettfärbung mit *Phalloidin* (1:300-Verdünnung) bei 4 °C unter Ausschluss von Licht für 30 Minuten. Nach abschließendem Waschen

## Material und Methoden

werden die Kammern entfernt und die Eindeckelung erfolgt mit Mowiol, versetzt mit Triethylendiamin.

## Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 NLR-Expression in basophilen Granulozyten

Sowohl murine als auch humane neutrophile Granulozyten, Monozyten und Dendritische Zellen exprimieren intrazelluläre und extrazelluläre PRRs (TLRs und NLRs) [58, 59]. Die Expression dieser Rezeptoren und deren Funktion in basophilen Granulozyten wurden bisher kaum charakterisiert.

Daher wurden unstimulierte und stimulierte basophile Granulozyten mit PBMCs verglichen. Hierfür wurde das Blut von insgesamt neun Probanden (n=9) analysiert. Unstimulierte PBMCs (Positivselektion nach der magnetischen Separation) wurden als Kontrollgruppe verwendet und die RNA-Expression in den untersuchten Bedingungen in basophilen bzw. eosinophilen Granulozyten dazu in Relation gesetzt. Hierfür wurde die Expression von unstimulierten PBMCs als „1“ festgesetzt. Nach Separation der basophilen Granulozyten erfolgte eine Stimulation über 12 Stunden mit LPS (c=1 µg/ml) und anti-FcεR1 (c=1 µg/ml). Parallel hierzu erfolgte eine Stimulation unter gleichen Bedingungen der PBMCs.

Wie Abbildung 5 zeigt, sind die meisten Nod-like Rezeptoren wie NLRP1, NLRP3 und IPAF in basophilen Granulozyten stärker als in PBMCs exprimiert. Ähnlich wie andere Zellen des Immunsystems, war die Expression von NLRP1 und NLRP3 unter einer Stimulation mit LPS (c=1 µg/ml, t=12h) verstärkt. Unter Stimulation mit anti-FcεR1 (c=1 µg/ml, t=12 h) konnten wir in basophilen Granulozyten eine noch stärkere Expression von NLRP3 zeigen, jedoch eine schwächere Expression von NLRP1 als in unstimulierten basophilen Granulozyten.

Ferner wurden NOD1 und NOD2 als Vertreter der intrazellulären Nod-like Rezeptoren nachgewiesen. Eine Expression dieser Rezeptoren lag sowohl unter Basal- als auch unter Stimulationsbedingungen (mit LPS und anti-FcεR1) vor (Abbildung 5).

## Ergebnisse

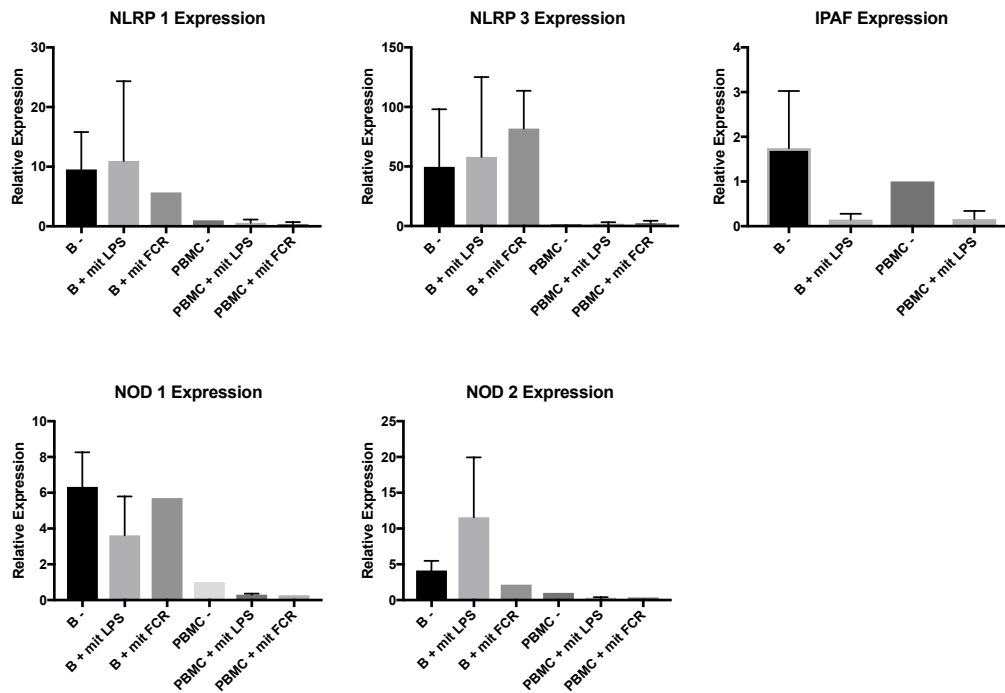


Abbildung 5: NLR Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) und anti-Fc $\epsilon$ R1 (+ mit FCR) stimulierten basophilen Granulozyten (B) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar.

So wurde demonstriert, dass auch basophile Granulozyten zahlreiche wichtige NLRs einschließlich der NLRs, die zur Bildung von Inflammasomen benötigt werden, besitzen.

### 3.2 Interleukin-1 Familienmitglieder in basophilen Granulozyten

Inflammasomen können Caspase-1 und indirekt IL-1 $\beta$ , IL-18 und teilweise auch IL-1 $\alpha$  aktivieren. Da basophile und eosinophile Granulozyten zahlreiche NLRs tragen, sollte im Folgenden die Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  betrachtet werden. Bekannt ist, dass IL-1 $\alpha$  von z. B. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird, während IL-1 $\beta$  neben Makrophagen und neutrophilen Granulozyten auch von Lymphozyten und Fibroblasten sezerniert wird [60].

## Ergebnisse

Basophile Granulozyten und PBMCs (n=9) wurden nach dem gleichen Prinzip wie im zuvor beschriebenen Experiment mit LPS (c=1 µg/ml), anti-FcεR1 (c=1 µg/ml) oder IL-33 (c=100 ng/ml) über 12 Stunden stimuliert, um die Expression der IL-1 Zytokine zu untersuchen.

Obwohl alle nötigen Rezeptoren zur Bildung des Inflammasoms und damit möglichen Spaltung und Aktivierung von IL-1 vorliegen, konnten wir auf RNA-Ebene keine Expression von IL-1α oder IL-1β in basophilen Granulozyten nachweisen. Auch unter Stimulation konnte keine Expression gezeigt werden (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu lag IL-1α und IL-1β in PBMCs vor. Die Expression konnte durch Stimulation mit LPS oder anti-FcεR1 gesteigert werden (Abbildung 6). Interessant dabei war, dass sowohl die Expression von IL-1α als auch die Expression von IL-1β in PBMCs unter der Stimulation mit anti-FcεR1 (c=1 µg/ml, t=12 h) stärker war als in unstimulierten PBMCs, jedoch deutlich niedriger als unter Stimulation mit LPS (c=1 µg/ml, t=12 h). Die höchste Expression von IL-1α beziehungsweise IL-1β konnte in PBMCs nach Stimulation mit IL-33 (c=100 ng/ml, t=12 h) gezeigt werden.

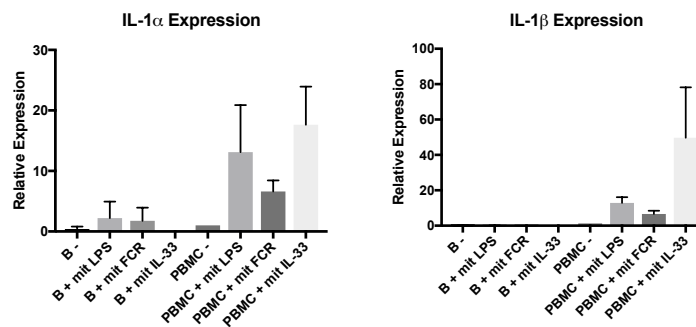


Abbildung 6: IL-1α und IL-1β Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS), mit anti-FcεR1 (+ mit FCR) oder mit IL-33 (+ mit IL-33) stimulierten basophilen Granulozyten (B) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar.

### 3.3 IL-33 und ST2 Rezeptor in basophilen Granulozyten

Durch mehrere Studien wurde aufgezeigt, dass IL-33 eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität ist [27, 45, 57, 61]. IL-33 mRNA konnte in



## Ergebnisse

Fibroblasten, Epithelzellen und Makrophagen nachgewiesen werden, ein Proteinnachweis gelang jedoch nicht [62, 63].

Daher wurden basophile Granulozyten auf die Expression von IL-33 und seines Rezeptors ST2 untersucht. Hierfür wurden basophile Granulozyten und PBMCs (n=9) nach der Separation in IL-3 angereichertem Medium für 12 Stunden mit LPS (c=1 µg/ml), anti-FcεR1 (c=1 µg/ml) oder IL-33 (c=100 ng/ml) stimuliert. Parallel hierzu erfolgte zum Vergleich eine Stimulation der PBMCs mit den gleichen Stimulanzen unter gleichen Bedingungen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des Versuches zuvor, bei dem in basophilen Granulozyten die untersuchten Interleukine IL-1α und IL-1β weder in unstimulierten noch in stimulierten nachgewiesen werden konnten, konnte bei diesem Versuch IL-33 mRNA bereits in unstimulierten basophilen Granulozyten gezeigt werden (Abbildung 7). Erneut wurden zur besseren Vergleichbarkeit PBMCs als Kontrollgruppe genutzt und die RNA-Expression in basophilen Granulozyten daran verglichen.

Diese basal vorhandene Expression von IL-33 in basophilen Granulozyten konnte durch Stimulation noch verstärkt werden. Jedoch nur nach Stimulation mit LPS (c=1 µg/ml, t=12 h) und nicht durch Stimulation mit anti-FcεRI (c=1 µg/ml, t=12 h) oder IL-33 (c=100 ng/ml, t=12 h). Die Expression von IL-33 war sogar durch die Stimulation mit anti-FcεRI oder IL-33 geringer als in unstimulierten basophilen Granulozyten.

Demgegenüber konnte eine IL-33 Expression in PBMCs weder unter Normalbedingungen noch unter stimulierten Bedingungen mit LPS, anti-FcεRI oder IL-33 gezeigt werden.

## Ergebnisse

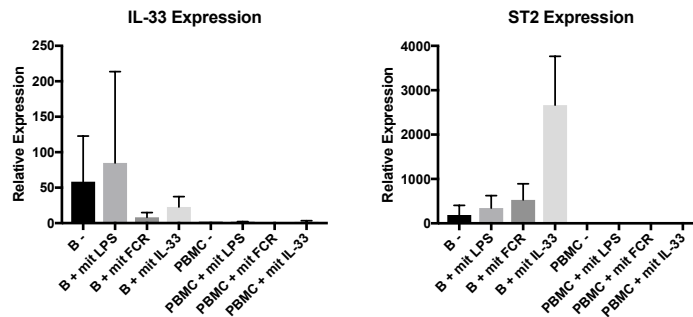


Abbildung 7: IL-33 und ST2 Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS), mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (+ mit FCR) oder mit IL-33 (+ mit IL-33) stimulierten basophilen Granulozyten (B) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar.

Nachdem IL-33 mRNA in basophilen Granulozyten detektiert wurde, wurde sein Rezeptor ST2 analysiert. Es zeigte sich unter Normalbedingungen eine hohe Expression des ST2 Rezeptors, welche sowohl durch Stimulation mit LPS (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) als auch durch anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) noch gesteigert werden konnte. Die mit Abstand höchste Induktion der Expression war unter Stimulation mit IL-33 (c=100 ng/ml, t=12 h) zu beobachten (Abbildung 7). Kongruent zu den Ergebnissen, welche keine mRNA Expression von IL-33 in PBMCs zeigte, konnte auch keine Expression des IL-33 Rezeptors ST2 in PBMCs nachgewiesen werden, weder unter unstimulierten noch unter stimulierten Bedingungen.

### 3.4 Zytokinsekretion basophiler Granulozyten

IL-33 mRNA wird von basophilen Granulozyten deutlich stärker als von anderen myeloiden Zellen des peripheren Blutes exprimiert. Daher wurde die Sekretion von IL-33 durch basophile Granulozyten betrachtet und untersucht, ob die mRNA in Protein umgeschrieben wird, welches intrazellulär vorliegt. In diesem Versuchsansatz wurden basophile Granulozyten und PBMCs nach der Separation

## Ergebnisse

in IL-3 haltigem Medium für 12 Stunden mit LPS (c=1 µg/ml) stimuliert. Zur genaueren Differenzierung wurden nach der Stimulation sowohl Zellkulturüberstände als auch lysierte Zellen mittels ELISA untersucht. Hiermit sollte die Sekretion des Proteins IL-33 aus der Zelle und das im Zytosol vorliegende Protein untersucht werden.

Parallel hierzu wurde im gleichen Ansatz das Protein IL-1α in basophilen Granulozyten und PBMCs untersucht.

Kongruent zu unseren PCR-Ergebnissen, bei denen keine mRNA Expression in basophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte, konnte auch im ELISA das Protein IL-1α nicht in basophilen Granulozyten gezeigt werden, weder in unstimulierten noch in stimulierten basophilen Granulozyten.

Im Gegensatz dazu konnten hohe Proteinmengen von IL-1α in PBMCs nachgewiesen werden. Zudem war die Menge an IL-1α unter Stimulationsbedingungen mit LPS (c=1 µg/ml, t=12 h) erhöht. Interessant war, dass IL-1α nur unter Stimulationsbedingungen im Überstand zu finden war, sodass eine basale Sekretion fehlte.

Trotz des Nachweises hoher Mengen von IL-33 in basophilen Granulozyten auf mRNA-Basis und erhöhter Expression unter Stimulationsbedingungen mit LPS (c= 1 µg/ml, t=12 h) gelang es uns nicht, das IL-33 Protein nachzuweisen. Weder im Überstand noch intrazellulär in den lysierten Zellen konnte IL-33 im ELISA detektiert werden.

### 3.5 Ergebnisse Western Blot

Nachdem der Proteinnachweis mittels ELISA nicht gelang, führten wir einen Western Blot durch. Für diesen Versuch wurden Fibroblasten sowie basophile und eosinophile Granulozyten verwendet. Unterschieden wurden unstimulierte, mit LPS (c=100 ng/ml, t=12 h) und mit LPS und Imiquimod/ R837 (c= 10 µg/ml, t=12h)

## Ergebnisse

stimulierte Fibroblasten sowie unstimulierte basophile und eosinophile Granulozyten.

Die Zellen wurden lysiert, bevor sie für den Versuch weiter benutzt wurden, um das intrazelluläre Protein detektieren zu können.

Für die Bildung des Inflammasoms sind neben den bereits oben genannten Nodlike Rezeptoren auch ASC und Caspase-1 notwendig. Im Folgenden wurden Fibroblasten als Kontrolle benutzt. Mittels Western Blot wurden basophile und eosinophile Granulozyten und Fibroblasten auf das Vorhandensein von ASC, Caspase-1 und IL-33 untersucht.

Wie schon die Ergebnisse des ELISA-Versuchsaufbaus zeigten, konnte das Protein IL-33 auch mittels Western Blot weder in basophilen noch in eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden, während Fibroblasten große Mengen an IL-33 Protein intrazellulär tragen (Abbildung 8). Die Banden größer und kleiner als 33 kDa deuten auf leichte unspezifische Bindung des Antikörpers hin. Das Signal der Basophilen und Eosinophilen hebt sich nicht deutlich vom Hintergrund ab und wurde somit als negativ gedeutet. Jedoch kann man davon ausgehen, dass der Antikörper funktioniert, da ein deutliches Signal bei den Fibroblasten bei 33 kDa zu sehen ist.

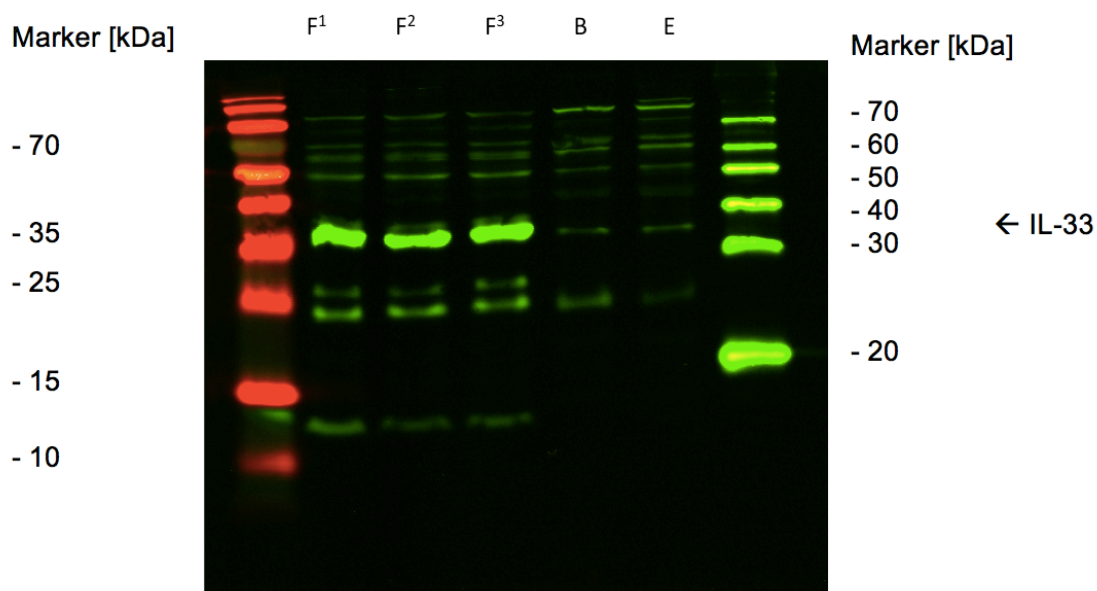


Abbildung 8: IL-33 (grün) Nachweis in unstimulierten Fibroblasten (F<sup>1</sup>), mit LPS (F<sup>2</sup>) oder in mit LPS und R837 stimulierten Fibroblasten (F<sup>3</sup>), in unstimulierten Basophilen (B) oder unstimulierten Eosinophilen (E).

## Ergebnisse

Aktin als wichtiger Bestandteil der Zellwand, welches ubiquitär vorkommt, war in allen Zellfraktionen identisch nachweisbar, sodass eine ähnliche Menge Protein vorlag. ASC, welches als Adaptermolekül im Inflammasom fungiert, ist in basophilen und eosinophilen Granulozyten im unten gezeigten Western Blot nicht detektierbar (fehlende grüne Bande bei basophilen und eosinophilen Granulozyten). Die übrigen Banden im unten gezeigten Western Blot sind als leichte unspezifische Bindungen zu deuten (Abbildung 9).

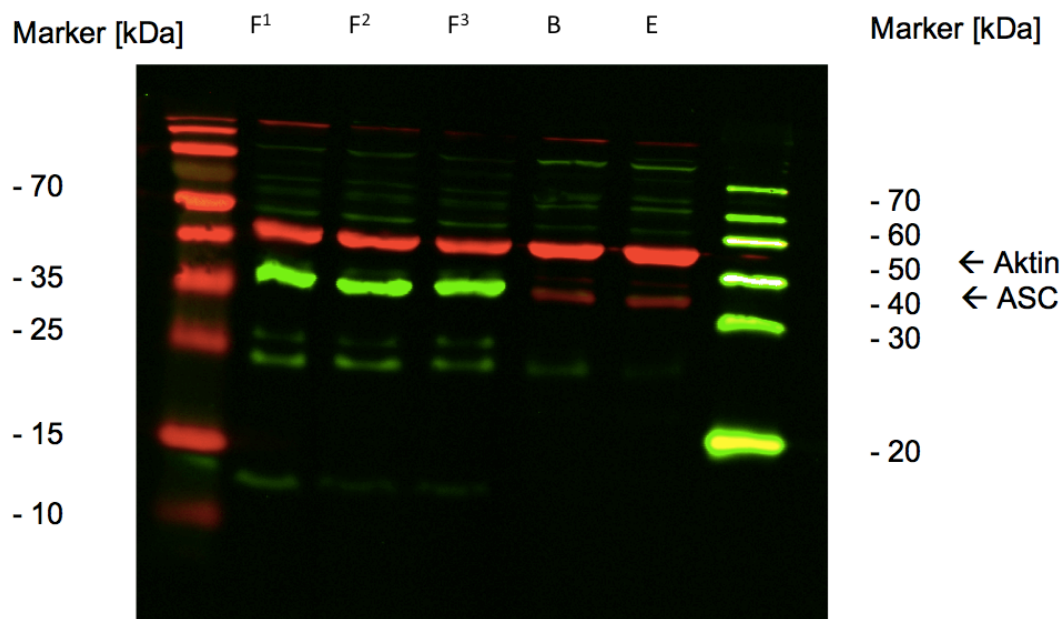


Abbildung 9: ASC (grün) und Aktin (rot) in unstimulierten Fibroblasten (F<sup>1</sup>), in mit LPS (F<sup>2</sup>) oder mit LPS und R837 stimulierten Fibroblasten (F<sup>3</sup>), in unstimulierten Basophilen (B) oder unstimulierten Eosinophilen (E).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil zur Bildung des Inflammasoms, Caspase 1, konnte in allen Versuchsreihen, sprich in Fibroblasten, basophilen und eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Abbildung 10).

## Ergebnisse

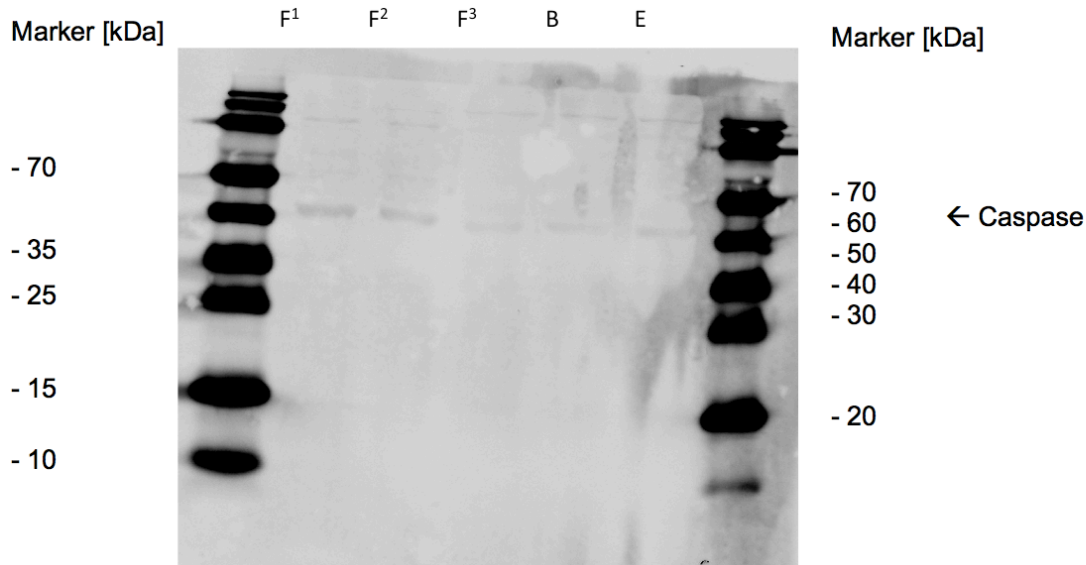


Abbildung 10: Caspase 1 Nachweis in unstimulierten Fibroblasten (F<sup>1</sup>), in mit LPS (F<sup>2</sup>) oder in mit LPS und R837 stimulierten Fibroblasten (F<sup>3</sup>), in unstimulierten Basophilen (B) oder unstimulierten Eosinophilen (E).

### 3.6 IL-33 Nachweis mittels Immunfluoreszenz in basophilen Granulozyten

Nachdem sowohl die IL-33 Transkription wie auch die mRNA-Induktion unter Stimulation mit LPS und anti-Fc $\epsilon$ R1 in basophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte, wurde mithilfe von Immunfluoreszenz das Protein in basophilen Granulozyten angefärbt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler Antikörper, der sich gegen IL-33 richtet, verwendet. Zur Visualisierung wurde der polyklonale Antikörper mit einem Sekundärantikörper (*Alexa Fluor Anti Rabbit*) gekoppelt. In den unten aufgeführten Abbildungen zeigt sich IL-33 rot gefärbt. Zur besseren Darstellung wurden die Zellkerne mit DAPI (*Hoechst*) und das Zytoskelett mit f-Aktin (*Phalloidin*) gefärbt.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, liegt IL-33 Protein sowohl im Zytosol als auch nukleär vor.

## Ergebnisse

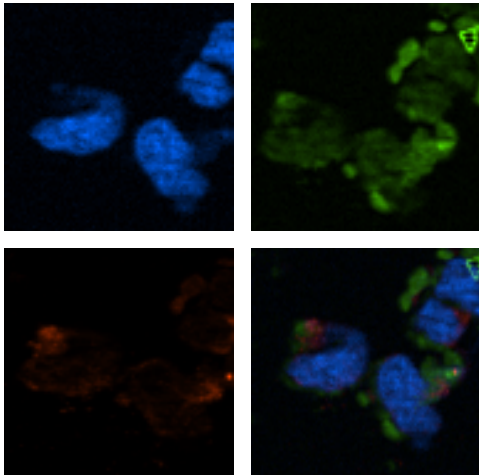


Abbildung 11: Humane basophile Granulozyten in der Immunfluoreszenzfärbung unter unstimulierten Bedingungen. Dargestellt sind die Kerne (blau), das Zytoskelett (grün) und IL-33 (rot).

Im Vergleich zu den unstimulierten basophilen Granulozyten konnte nach Stimulation mit LPS ( $c=1 \mu\text{g/ml}$ ,  $t=4 \text{ h}$ ) (Abbildung 12) eine verstärkte IL-33 Expression in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Insbesondere die perinukleäre zytoplasmatische Expression scheint zuzunehmen.

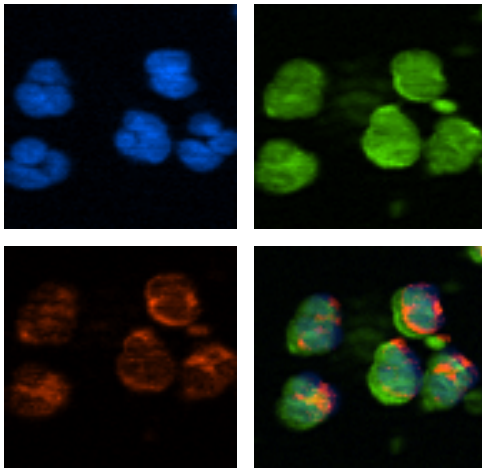


Abbildung 12: Humane basophile Granulozyten in der Immunfluoreszenzfärbung nach Stimulation mit LPS ( $c=1 \mu\text{g/ml}$ ,  $t=4 \text{ h}$ ). Dargestellt sind die Kerne (blau), das Zytoskelett (grün) und IL-33 (rot).

## Ergebnisse

Auch in der Immunfluoreszenzfärbung von basophilen Granulozyten nach Stimulation mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=4 h) war IL-33 Protein nachweisbar (Abbildung 13).

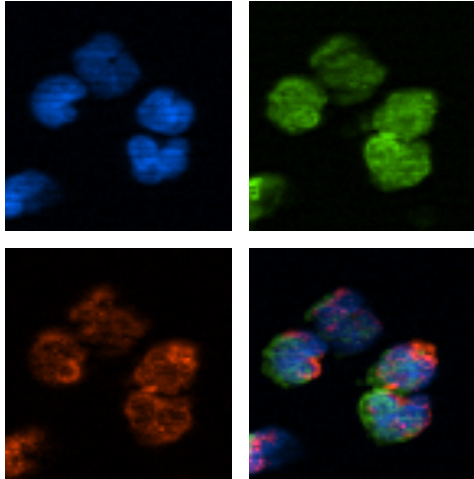


Abbildung 13: Humane basophile Granulozyten in der Immunfluoreszenzfärbung nach einer Stimulation mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=4 h). Dargestellt sind die Kerne (blau), das Zytoskelett (grün) und IL-33 (rot).

Mithilfe der Immunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass IL-33 sowohl im Kern als auch im Zytosol der basophilen Granulozyten vorliegt. Dies konnte mithilfe der verwendeten Antikörper (*Bio Orbyt IL-33, Alexa Fluor 594*) in unstimulierten und verstärkt in TLR4- bzw. IgE-Rezeptor-aktivierten basophilen Granulozyten gezeigt werden.

### 3.7 NLRs in eosinophilen Granulozyten

Nach dem Nachweis aller notwendigen Bestandteile für die Bildung des Inflammasoms in basophilen Granulozyten wurden in einem ähnlichen Versuchsansatz eosinophile Granulozyten (n=8) auf die Expression dieser NLRs untersucht. Als Vergleichsgruppe wurden erneut PBMCs (Positivselektion) unter unstimulierten Bedingungen gewählt und die Expression der RNA daran verglichen.



## Ergebnisse

Hierzu wurden eosinophile Granulozyten nach der Separation mit LPS (c=1 µg/ml) oder anti-FcεR1 (c=1 µg/ml) über 12 Stunden stimuliert. Parallel dazu erfolgte eine Stimulation der PBMCs mit den gleichen Stimulantien und Bedingungen.

Wie in Abbildung 14 zu sehen, konnte in eosinophilen Granulozyten ein Nachweis der intrazellulären Rezeptoren NOD1 und NOD2 auf mRNA Basis erfolgen. Die Expression der beiden Rezeptoren war gegenüber der Expression in PBMCs deutlich verstärkt. In eosinophilen Granulozyten änderte sich die Expression von NOD1 unter Stimulationsbedingungen mit LPS (c=1 µg/ml, t=12 h) oder anti-FcεR1 (c=1 µg/ml, t=12 h) und fiel geringer aus als unter Normalbedingungen. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von NOD2 unter Stimulation mit LPS (c=1 µg/ml, t=12 h) gesteigert werden, unter Stimulation mit anti-FcεR1 (c=1 µg/ml, t=12 h) fiel die Expression jedoch ebenfalls geringer aus als unter Normalbedingungen.

Im Gegensatz zu basophilen Granulozyten konnte in eosinophilen Granulozyten nur eine geringe Expression von NLRP3 unter Normalbedingungen nachgewiesen werden. Diese Expression konnte unter Stimulation mit LPS (c=1 µg/ml) gering gesteigert werden, unter Stimulation mit anti-FcεR1 (c=1 µg/ml) fiel diese jedoch geringer aus als unter Normalbedingungen aus. Ähnlich verhielt sich die Expression von NLRP1 in eosinophilen Granulozyten.

## Ergebnisse

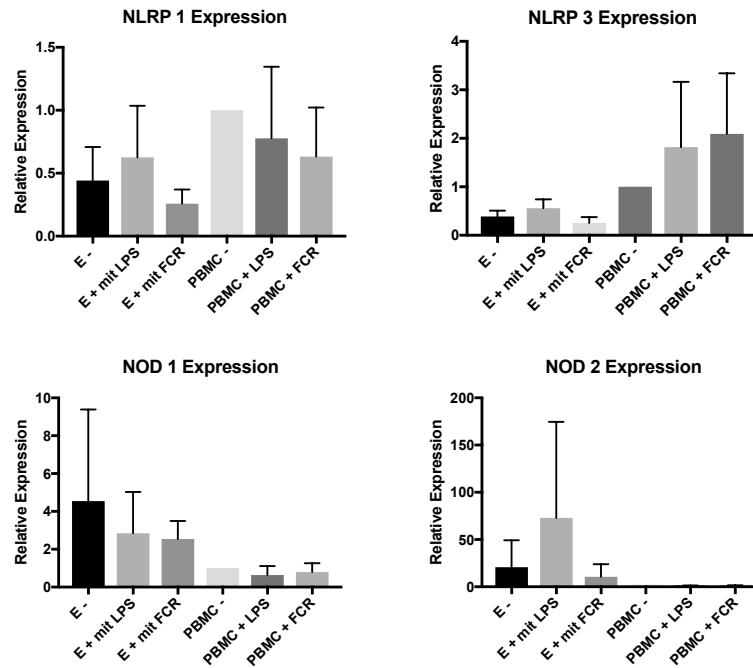


Abbildung 14: NLR Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) oder mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (+ mit FCR) stimulierten eosinophilen Granulozyten (E) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar.

### 3.8 Interleukin 1-Zytokine in eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten (n=8) wurden analog der basophilen Granulozyten bezüglich der Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  untersucht. Hierzu wurden eosinophile Granulozyten nach der Separation und PBMCs als Kontrollgruppe für 12 Stunden mit LPS (c=1  $\mu$ g/ml) oder anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml) stimuliert und anschließend die mRNA Expression der jeweiligen Interleukine an der Expression von unstimulierten PBMCs verglichen.

Wie oben beschrieben, konnte in basophilen Granulozyten keine mRNA Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gezeigt werden. In diesem Versuch konnte auch in eosinophilen Granulozyten sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Stimulationsbedingungen mit LPS (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) oder anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) keine mRNA Expression für diese beiden Interleukine nachgewiesen

## Ergebnisse

werden. Wie Abbildung 15 zeigt, konnte eine Expression für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nur in PBMCs nachgewiesen werden, insbesondere nach Stimulation durch LPS (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) und eine schwächere Expression nach IgE-Rezeptor Aktivierung.

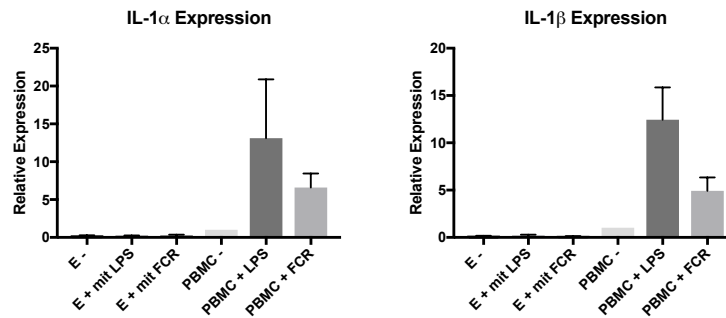


Abbildung 15: IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) oder mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (+ mit FCR) stimulierten eosinophilen Granulozyten (E) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar.

### 3.9 IL-33 und ST2 in eosinophilen Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind an einer T<sub>H</sub>-2 Antwort des Immunsystems beteiligt [64]. Nachdem kein Nachweis der Interleukine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in eosinophilen Granulozyten gelang, widmeten wir uns IL-33 und seinem passenden Rezeptor ST2.

Eosinophile Granulozyten und PBMCs (n=8) wurden, wie im vorherigen Versuch, mit LPS (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) oder anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) stimuliert, um die Expression von IL-33 und ST2 zu untersuchen. Es konnte bereits in nicht-behandelten eosinophilen Granulozyten eine hohe IL-33 Expression auf RNA-Basis nachgewiesen werden. Diese Expression konnte jedoch nicht weiter gesteigert werden, sondern wurde unter Stimulation mit LPS (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) beziehungsweise anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) sogar supprimiert. Wie schon im oben beschriebenen Versuch mit basophilen Granulozyten konnte in diesem Versuchsansatz keine IL-33 Expression in PBMCs nachgewiesen werden. Auch

## Ergebnisse

unter Stimulationsbedingungen mit LPS (c=1 µg/ml, t=12 h) oder anti-FcεR1 (c=1 µg/ml, t=12 h) konnte keine Expression von IL-33 in PBMCs hervorgerufen werden.

Ferner wurden eosinophile Granulozyten auf die Expression des IL-33 Rezeptors ST2 untersucht. Ähnlich der Ergebnisse der basophilen Granulozyten, war bei eosinophilen Granulozyten die mRNA-Expression für ST2 unter Normalbedingungen hoch. Diese bereits hohe Expression konnte unter Stimulationsbedingungen mit LPS (c=1 µg/ml, t=12 h) sogar noch gesteigert werden. Im Unterschied zu basophilen Granulozyten war die Expression nach Stimulation mit anti-FcεR1 (c=1 µg/ml, t=12 h) jedoch niedriger als im unstimulierten Zustand (Abbildung 16).

PBMCs zeigten weder eine IL-33- noch eine ST2-Expression.

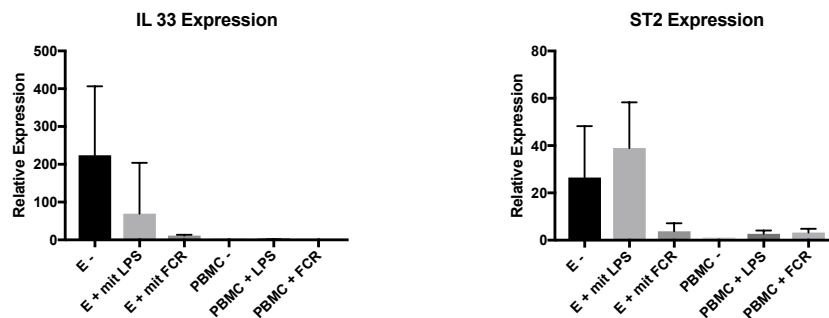


Abbildung 16: IL-33 und ST2 Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) oder mit anti-FcεR1 (+ mit FCR) stimulierten eosinophilen Granulozyten (E) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar.

### 4. Diskussion

Das menschliche Blut besteht neben dem Blutplasma aus einer Vielzahl verschiedener zellulärer Bestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten). Dabei werden die Leukozyten noch einmal in Granulozyten (eosinophile, basophile und neutrophile), Monozyten und Lymphozyten unterteilt, welche in unterschiedlicher Anzahl vorkommen. Die Granulozyten werden nach dem Färbeverhalten benannt und dienen, genau wie die Monozyten, der unspezifischen Immunabwehr, während die Lymphozyten an der spezifischen Immunabwehr beteiligt sind. Die basophilen und eosinophilen Granulozyten machen dabei den geringsten Anteil aus. Mit nur 0-1 % aller Leukozyten sind die Basophilen mit der geringsten Anzahl vertreten, mit nur knapp 2-4 % folgen die eosinophilen Granulozyten. Wegen des spärlichen Vorkommens und der über viele Jahre hinweg schwierigen Isolationsmöglichkeiten wurde diesen beiden Subtypen der Granulozyten lange Zeit wenig Beachtung geschenkt.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass sowohl humane als auch murine Neutrophile, Monozyten und Dendritische Zellen Pattern-Recognition Rezeptoren (PPR) exprimieren [58, 59]. Dazu zählen sowohl membranständige oder endosomale Toll-like Rezeptoren (TLR) als auch intrazelluläre Nod-like Rezeptoren (NLR). Einige der NLRs werden zur Bildung von Inflammasomen benötigt, welche über Caspasen an der Aktivierung einer Entzündung beteiligt sind [7, 8]. Diese Caspasen können verschiedene Interleukine aktivieren bzw. inaktivieren, unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33 [14, 30].

Diese Inflammasome und ihre einzelnen Bestandteile sind in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bestens erforscht. So wurde beschrieben, dass neutrophile Granulozyten und Makrophagen an der körpereigenen Abwehr beteiligt sind, indem sie auf mikrobielle und sterile Gefahrensignale reagieren können [60].

Basophile und eosinophile Granulozyten sind dagegen an der allergischen Soforttyp-Reaktion beteiligt. Durch IgE Bindungen an einen an der Zelloberfläche befindlichen IgE-Rezeptor kann es zur Histaminausschüttung durch Degranulation von basophilen Granulozyten kommen [65]. Der für die IgE Bindung benötigte Fc-

## Diskussion

Rezeptor wird sowohl auf der Zelloberfläche der basophilen als auch auf der Oberfläche der eosinophilen Granulozyten exprimiert [66]. Durch die Histaminausschüttung kommt es zur Vasodilatation und zu den Symptomen einer allergischen Reaktion mit Ödem, Erythem, bis hin zum anaphylaktischen Schock.

Aber nicht nur IgE-vermittelt kommt es zur Degranulation von Basophilen, auch andere Kofaktoren wie Bakterien und Viren oder nicht-steroidale Analgetika können im Rahmen einer parainfektösen oder pseudoallergischen Reaktion zur Degranulation von basophilen Granulozyten und Mastzellen führen [67].

Mit diesem Hintergrundwissen untersuchten wir basophile und eosinophile Granulozyten auf die Expression verschiedener NLRs, inflammatorischer Caspasen und Interleukin-1 Zytokine. Wir verglichen die mRNA Expression sowie Proteinsynthese und -sekretion der basophilen und eosinophilen Granulozyten. Als Referenz wurden die peripheren mononukleären Zellen des Blutes nach der magnetischen Separation von basophilen bzw. eosinophilen Granulozyten, die positiv selektierten PBMCs, verwendet.

Wir konnten zeigen, dass basophile Granulozyten die meisten Nod-like Rezeptoren wie NLRP1, NLRP3 und IPAF transkribieren, welche für die Bildung des Inflammasoms benötigt werden.

Wie auch in anderen Zellen des angeborenen Immunsystems wurde durch Stimulation mit LPS als Toll-like Rezeptor 4 Liganden, IgE-Rezeptor-Aktivierung mit anti-Fc $\epsilon$ R1 und durch das Zytokin IL-33 eine Induktion dieser Rezeptoren erzeugt.

Zudem konnten wir NOD1 und NOD2 als Vertreter der intrazellulären Rezeptoren, deren Stimulation zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt, nachweisen.

Da basophile und eosinophile Granulozyten an allergischen Reaktionen beteiligt sein können, untersuchten wir eosinophile Granulozyten ebenfalls auf die Expression dieser Nod-like Rezeptoren.

Die Expression von NLRP1, NLRP3, NOD1 und NOD2 war in eosinophilen Granulozyten analog zu basophilen Granulozyten nachweisbar. Das Verhalten unter Stimulation mit LPS oder anti-Fc $\epsilon$ R1 war ähnlich. NLRP3 war in eosinophilen Granulozyten im Vergleich zu Basophilen nur schwach exprimiert.

## Diskussion

Mit dem Nachweis von NLRP1, NLRP3 und IPAF, die für die Bildung von Inflammasomen nötig und an der Aktivierung von Vertretern der IL-1 Zytokine beteiligt sind, untersuchten wir im nächsten Schritt die mRNA Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowohl in basophilen als auch eosinophilen Granulozyten als mögliches Substrat für die über Inflammasome aktivierte Caspase-1.

Obwohl wir alle Bestandteile der Inflammasomen nachweisen konnten, die für die Aktivierung von IL-1 $\beta$  benötigt werden, konnte weder in eosinophilen noch in basophilen Granulozyten eine Expression von IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. In der PBMC-Kontrollgruppe lag dagegen sowohl IL-1 $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  vor. Wie bereits mehrfach publiziert, konnten auch wir eine vermehrte Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in PBMCs nach Stimulation mit z. B. LPS (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) oder anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=12 h) aufzeigen [23, 24]. Somit regulieren nicht die NLRP-Proteine die Ausschüttung der IL-1 Zytokine, sondern das Muster der IL-1 Familienmitglieder-Expression.

Neuere Studien zeigen, dass basophile Granulozyten durch IL-33 aktiviert werden und damit eine wichtige Rolle bei Erkrankungen wie Asthma bronchiale, Rheumatoider Arthritis, Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen spielen [30, 61, 68].

In dieser Arbeit waren basophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten die einzige Population der PBMCs, welche durch IL-33 aktiviert wurden. Dieses Phänomen hat ebenfalls die Arbeitsgruppe um Pecaric-Petkovic et al. [69] gezeigt. Hierdurch wird die Bedeutung von IL-33 als einzigem IL-1 Zytokin des angeborenen Immunsystems bei einer T<sub>H</sub>-2 Stimulation deutlich [55, 69, 70]. Da IL-33 vermutlich unabhängig von Inflammasomen und Caspase-1 prozessiert und aktiviert wird [30, 71], ist hier die zelltypspezifische Expression von IL-33 im Vergleich zu IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  entscheidend.

Daraufhin untersuchten wir die mRNA Expression von IL33 und seines Rezeptors ST2 in basophilen und eosinophilen Granulozyten.

## Diskussion

Wir konnten zeigen, dass IL-33 schon in Ruhebedingungen in beiden Granulozyten stark exprimiert wird. Die Expression von IL-33 war in basophilen und eosinophilen Granulozyten unter Stimulationsbedingungen unterschiedlich:

In basophilen Granulozyten war die Expression von IL-33 nach Stimulation mit LPS am höchsten ausgeprägt. Etwas niedriger als unter Normalbedingungen war die Expression nach Stimulation des IgE-Rezeptors mit anti-Fc $\epsilon$ R1. Nach Stimulation mit IL-33 waren die Werte nahezu gleich wie unter Normalbedingungen. Dies kann als negative Rückkopplung unter Stimulation mit IL-33 gedeutet werden.

In eosinophilen Granulozyten hingegen war die Expression von IL-33 unter Normalbedingungen am höchsten. Unter Stimulationsbedingungen mit LPS und anti-Fc $\epsilon$ R1 war das Expressionslevel niedriger als unter Normalbedingungen.

Dieser Unterschied ist auch funktionell zu erklären, da Basophile klassischerweise analog den Mastzellen bei IgE-vermittelten Reaktionen eine bedeutendere Rolle als eosinophile Granulozyten besitzen, da sie nach IgE-Rezeptor-Aktivierung eine Menge von Mediatoren ausschütten.

Obwohl wir eine hohe Expression von IL-33 nachweisen konnten, gelang uns weder in basophilen noch in eosinophilen Granulozyten der Nachweis des Proteins, weder intrazellulär noch seine Sekretion mittels Western Blot oder ELISA.

Nachdem IL-33 selbst und seine Wirkung auf basophile und eosinophile Granulozyten untersucht wurde, untersuchten wir die Expression seines Rezeptors ST2.

ST2 wird besonders stark auf basophilen Granulozyten exprimiert. Schon unter Normalbedingungen ist eine starke Expression nachweisbar, welche aber durch Stimulation mit LPS, anti-Fc $\epsilon$ R1 und IL-33 noch bedeutend gesteigert werden konnte.

Eosinophile Granulozyten verhielten sich dagegen erneut different. Hier war bereits unter Normalbedingungen eine hohe Expression auf mRNA Basis von ST2



## Diskussion

zu sehen. Diese bereits hohe Expression konnte durch Stimulation mit LPS gesteigert werden. Unter Stimulation mit anti-Fc $\epsilon$ R1 fiel die Expression jedoch deutlich schwächer aus und sank unter das Expressionsniveau der Basalbedingung. Insgesamt war die Expression von ST2 in basophilen Granulozyten jedoch deutlich höher als in eosinophilen Granulozyten. Dies bestätigt eine Publikation von Suzukawa et al. [45], die eine höhere Expression von ST2 auf der Oberfläche von basophilen Granulozyten im Vergleich zu eosinophilen oder neutrophilen Granulozyten demonstrierte.

Nachdem IL-33 ausschließlich als mRNA jedoch nicht als Protein im Western Blot oder ELISA nachgewiesen werden konnte, wurden basophile Granulozyten in Chamberslides kultiviert, stimuliert und mittels Fluoreszenz-Antikörpern gefärbt. Gefärbt wurde das Protein IL-33 in basophilen Granulozyten unter Normalbedingungen, unter Stimulation mit LPS und unter Stimulation mit anti-Fc $\epsilon$ R1. Wie schon auf mRNA Ebene gezeigt, konnte eine IL-33 Expression in basophilen Granulozyten unter unstimulierten Konditionen bestätigt werden. Nach Stimulation der basophilen Granulozyten über Nacht (12 Stunden) mit LPS beziehungsweise anti-Fc $\epsilon$ R1 konnte eine verstärkte Fluoreszenz nachgewiesen werden. In der Immunfluoreszenzfärbung ist die Gefahr einer unspezifischen Bindung erhöht, ebenso ist eine quantitative Aussage nur eingeschränkt möglich. In unserer Färbung konnte sowohl eine verstärkte zytosolische als auch eine verstärkte nukleäre Expression des Proteins IL-33 nachgewiesen werden. Das Verteilungsmuster passt gut zu einer bereits vorbeschriebenen IL-33 Expression, auch die vermehrte Färbeintensität nach Stimulation ist hiermit vereinbar [72].

Schon lange ist bekannt, dass basophile Granulozyten durch die Ausschüttung von Mediatoren wie IL-4 und Produktion von T<sub>H</sub>-2 Zytokinen eine wichtige Rolle bei der Entzündung, bei Typ 1 Allergien und im Rahmen der Atopie spielen [69, 73].

Aus unseren Ergebnissen schließen wir, dass basophile und eosinophile Granulozyten sich in der Expression der IL-1 Familie sehr ähnlich sind, jedoch nicht bei der Expression der Nod-like Rezeptoren. Denn der Nod-like Rezeptor

## Diskussion

NLRP3 wird von eosinophilen Granulozyten deutlich schwächer als in basophilen Granulozyten exprimiert. Obwohl beide Granulozyten die passende Ausstattung an Inflammasomen zur Aktivierung von IL-1 Vertretern besitzen, konnte wir weder IL-1 $\alpha$  noch IL-1 $\beta$  in basophilen noch eosinophilen Granulozyten nachweisen. Daher kann eine IL-1 Sekretion weder in basophilen noch in eosinophilen Granulozyten erfolgen.

Auffällig ist die zum Teil hohe Standardabweichung in unseren PCR Ergebnissen. Dies beruht zum einen auf der biologischen Variabilität der untersuchten Probanden, die auf eine unterschiedliche Atopieneigung zurückgeführt werden kann. Zum anderen führt die geringe Zellzahl basophiler und eosinophiler Granulozyten im Blut zu einer kleinen Gesamtpopulation untersuchter Zellen.

Wünschenswert wäre ein Pooling aller Zellen der unterschiedlichen Probanden, um so eine hohe Gesamtzellzahl erreichen zu können und die probandenspezifischen Ergebnisse zu nivellieren. Die Signifikanz der Ergebnisse konnte daher nicht statistisch erfasst werden und wurde deskriptiv analysiert.

Obwohl die Zellen keine IL-1 $\alpha$  noch IL-1 $\beta$  Sekretion durchführen, kann die Expression des IL-33-Rezeptors (ST2) auf basophilen und eosinophilen Granulozyten und die Expression von IL-33 selber eine Schlüsselfunktion der IL-33/ST2 Achse in der frühen Pathogenese von T<sub>H</sub>-2 dominierender Entzündung sein. IL-33 kann somit nicht nur einen Effekt auf Lymphozyten, sondern auch auf die Effektor-Zellen wie Eosinophile und Basophile selber haben [30, 45, 69]. Interessant dabei ist, dass IL-33 basophile Granulozyten zur Produktion von Fc $\epsilon$ RI-induzierten Mediatoren (wie z.B. Histamin und Leukotrien C<sub>4</sub>) anregt, ohne dass der Granulozyt dabei degranuliert [74].

*In-vivo*-Experimente haben gezeigt, dass IL-33 histologisch nachvollziehbare Effekte in verschiedenen Geweben von Lunge und Magen-Darm-Trakt hervorruft. Hierbei ist vor allem eine Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in die Schleimhaut aufgefallen. Daneben zeigte sich eine vermehrte Schleimproduktion sowie eine epitheliale Hyperplasie und Hypertrophie [27, 56]. Noch immer ist unklar welche Zelle IL-33 produziert oder sezerniert. Es gibt jedoch

## Diskussion

Berichte über eine Sekretion von Epithelzellen der Lunge und Glattmuskelzellen [29].

Vor allem weil Eosinophile gehäuft im peripheren Gewebe auftreten und im Vergleich zu Basophilen in größerer Zahl vorliegen, ist IL-33 an allergischen Reaktionen im Gewebe beteiligt. Ein wichtiger Mediator für eosinophile Granulozyten ist IL-5. Es führt zu einer vermehrten Differenzierung und Ausschüttung reifer Eosinophiler aus dem Knochenmark [27, 75]. In IL-33 stimulierten Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine hohe Eosinophilenrate im Blut mit einem hohen IL-5 Serum Level vergesellschaftet war [27] und so IL-33 einen Einfluss auf eosinophile Granulozyten haben muss.

IL-33 wird genauso wie IL-1 $\beta$  und IL-18 mittels Caspase 1 gespalten [69]. Interessant ist, dass vor allem in basophilen Granulozyten alle wichtigen Bestandteile zur Produktion, Aktivierung und Sekretion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vorhanden sind, die Interleukine selbst jedoch nicht nachweisbar waren. Ähnlich verhalten sich eosinophile Granulozyten. Auch hier konnten wir alle wichtigen Bestandteile für die Produktion, Aktivierung und Sekretion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachweisen, jedoch die Interleukine selbst nicht. Im Gegensatz zu IL-1 $\beta$  und IL-18 wird IL-33 durch Caspase 1 nicht aktiviert, sondern inaktiviert [30]. Zudem scheint IL-33 eine andere Rolle im Organismus als IL-1 $\beta$  und IL-18 zu spielen [56]. Durch die Aktivierung von basophilen und eosinophilen Granulozyten mittels IL-33 über den passenden Rezeptor, der auf beiden Zellpopulationen exprimiert ist, scheint der IL-33/ ST2 Pathway eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von allergischen Reaktionen und im angeborenen Immunsystem zu haben.

### 5. Zusammenfassung

Basophile und eosinophile Granulozyten sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Sie spielen eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen und sind an der T<sub>H</sub>-2 vermittelten Antwort beteiligt.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass eosinophile Granulozyten durch Zytokinsekretion und Freisetzung von Granula an der Modulation einer Entzündung beteiligt sind [57]. Aber auch basophile Granulozyten können durch Degranulation und Ausschüttung ihrer Zytokine und Mediatoren wie z. B. Histamin zur allergischen Inflammation beitragen [45].

In dieser Arbeit haben wir uns mit basophilen und eosinophilen Granulozyten und deren Nod-like Rezeptoren und IL-1 Zytokine beschäftigt. Lange Zeit wurde diesen beiden Granulozyten wegen des geringen Vorkommens und der schwierigen Isolationsmöglichkeiten nur wenig Beachtung geschenkt.

Wir konnten zeigen, dass basophile und eosinophile Granulozyten sich in der Expression der Nod-like Rezeptoren unterscheiden, jedoch alle nötigen NLR exprimieren, welche zur Bildung von Inflammasomen benötigt werden. Basophile Granulozyten exprimieren die Nod-like Rezeptoren NLRP1, NLRP3, IPAF, NOD1 und NOD2. Eosinophile Granulozyten haben ein ähnliches Expressionsmuster. Wir konnten jedoch zeigen, dass NLRP3 in eosinophilen Granulozyten im Vergleich zu basophilen Granulozyten schwächer exprimiert wird. Obwohl alle Bestandteile zur Inflammasomformation vorliegen, kommt es zu keiner IL-1 Sekretion, da weder eosinophile noch basophile Granulozyten IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  exprimieren oder sezernieren, anders als andere PBMCs des peripheren Blutes, welche sowohl IL-1 $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  mRNA exprimieren. Diese Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  konnte durch Stimulation mit LPS und anti-Fc $\epsilon$ R1 in PBMCs noch gesteigert werden, in Basophilen oder Eosinophilen jedoch nicht. Im Gegensatz hierzu konnten wir jedoch in basophilen und eosinophilen Granulozyten IL-33 nachweisen.

## Zusammenfassung

IL-33 mRNA liegt in beiden Populationen bereits in Ruhe vor, seine Expression konnte durch Stimulation mit LPS in basophilen Granulozyten sogar noch weiter gesteigert werden. Leider gelang ein Proteinnachweis von IL-33 in keinem Zelltyp mittels Western Blot oder ELISA, lediglich in der Fluoreszenzmikroskopie ließ sich das Protein darstellen. Hier lag IL-33 nukleär und zytosolisch vor.

Neben IL-33 selbst konnten wir im nächsten Schritt seinen Rezeptor ST2 in beiden Granulozyten mittels PCR detektieren. Die Expression von ST2 in basophilen Granulozyten wird durch IL-33 supprimiert, vermutlich als negatives Feedback nach Rezeptorstimulation.

Zusammengefasst demonstriert die durchgeführte Arbeit, dass basophile und eosinophile Granulozyten eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem haben. Die Präsenz von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Neutrophilen und Makrophagen und von IL-33 in basophilen und eosinophilen Granulozyten kann die Manifestation einer allergischen Erkrankung durch Zytokine des angeborenen Immunsystems erklären.

6. Abbildungen und Tabellen

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Humaner basophiler Granulozyt mit unterschiedlichen Granula (Quelle: Website: <http://www2.nau.edu/~fpm/immunology/blood.html> benutzt am 13.11.2017 [37]) ..... 8

Abbildung 2: Humane eosinophile Granulozyten aus peripherem Blut. Gefärbt mit einem modifizierten Giemsa Farbstoff (Dade Behring AG, Dudingon, Switzerland). Bild entnommen von Courtesy of Drs Kimberly D. Dyer and Jennifer M. Moser, Laboratory of Allergic Diseases, NIAID [48]. ..... 9

Abbildung 3: PBMC-Isolierung durch Dichtegradientenzentrifugation..... 18

Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer 24-Well Platte mit unterschiedlichen Stimulationsbedingungen ..... 21

Abbildung 5: NLR Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) und anti-FcεR1 (+ mit FCR) stimulierten basophilen Granulozyten (B) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar. .... 31

Abbildung 6: IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS), mit anti-FcεR1 (+ mit FCR) oder mit IL-33 (+ mit IL-33) stimulierten basophilen Granulozyten (B) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar. .... 32

Abbildung 7: IL-33 und ST2 Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS), mit anti-FcεR1 (+ mit FCR) oder mit IL-33 (+ mit IL-33) stimulierten basophilen Granulozyten (B) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar..... 34

## Abbildungen und Tabellen

- Abbildung 8: IL-33 (grün) Nachweis in unstimulierten Fibroblasten ( $F^1$ ), mit LPS ( $F^2$ ) oder in mit LPS und R837 stimulierten Fibroblasten ( $F^3$ ), in unstimulierten Basophilen (B) oder unstimulierten Eosinophilen (E)..... 36
- Abbildung 9: ASC (grün) und Aktin (rot) in unstimulierten Fibroblasten ( $F^1$ ), in mit LPS ( $F^2$ ) oder mit LPS und R837 stimulierten Fibroblasten ( $F^3$ ), in unstimulierten Basophilen (B) oder unstimulierten Eosinophilen (E). ..... 37
- Abbildung 10: Caspase 1 Nachweis in unstimulierten Fibroblasten ( $F^1$ ), in mit LPS ( $F^2$ ) oder in mit LPS und R837 stimulierten Fibroblasten ( $F^3$ ), in unstimulierten Basophilen (B) oder unstimulierten Eosinophilen (E)..... 38
- Abbildung 11: Humane basophile Granulozyten in der Immunfluoreszenzfärbung unter unstimulierten Bedingungen. Dargestellt sind die Kerne (blau), das Zytoskelett (grün) und IL-33 (rot)..... 39
- Abbildung 12: Humane basophile Granulozyten in der Immunfluoreszenzfärbung nach Stimulation mit LPS (c=1  $\mu$ g/ml, t=4 h). Dargestellt sind die Kerne (blau), das Zytoskelett (grün) und IL-33 (rot)..... 39
- Abbildung 13: Humane basophile Granulozyten in der Immunfluoreszenzfärbung nach einer Stimulation mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (c=1  $\mu$ g/ml, t=4 h). Dargestellt sind die Kerne (blau), das Zytoskelett (grün) und IL-33 (rot). ..... 40
- Abbildung 14: NLR Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) oder mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (+ mit FCR) stimulierten eosinophilen Granulozyten (E) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar. .... 42
- Abbildung 15: IL-1  $\alpha$  und IL-1  $\beta$  Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) oder mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (+ mit FCR) stimulierten eosinophilen Granulozyten (E) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar. .... 43
- Abbildung 16: IL-33 und ST2 Expression in unstimulierten (-), mit LPS (+ mit LPS) oder mit anti-Fc $\epsilon$ R1 (+ mit FCR) stimulierten eosinophilen Granulozyten (E) oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Die X-Achse zeigt

## Abbildungen und Tabellen

die jeweiligen Zellpopulationen unter verschiedenen Konditionen. Die Y-Achse stellt die relative Expression im Vergleich zu unstimulierten PBMCs dar. .... 44

### 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien .....	13
Tabelle 2: Pufferlösungen.....	14
Tabelle 3: Material .....	15
Tabelle 4: Geräte .....	16
Tabelle 5: Kits.....	16



7. Literaturverzeichnis

1. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
2. Groß, U., *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2013.
3. Seong, S.Y. and P. Matzinger, *Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 469-78.
4. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
5. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
6. Colomba, C., et al., *[Role of combination NK/KIRs in the natural history of viral infections.]*. Recent Prog Med, 2017. **108**(7): p. 333-337.
7. Spellberg, B. and J.E. Edwards, Jr., *Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(1): p. 76-102.
8. Fahy, J.V., *Type 2 inflammation in asthma--present in most, absent in many*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(1): p. 57-65.
9. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
10. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
11. Lupfer, C. and T.D. Kanneganti, *Unsolved Mysteries in NLR Biology*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 285.
12. Franchi, L., et al., *Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 106-28.
13. Yang, C.A. and B.L. Chiang, *Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2015. **61**: p. 1-8.
14. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
15. Amer, A., et al., *Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host IpaF*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 35217-23.
16. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages*. Cell Microbiol, 2006. **8**(11): p. 1812-25.
17. Tattoli, I., et al., *The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation*. Semin Immunopathol, 2007. **29**(3): p. 289-301.
18. Kufer, T.A., D.J. Banks, and D.J. Philpott, *Innate immune sensing of microbes by Nod proteins*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1072**: p. 19-27.
19. Palomo, J., et al., *The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases*. Cytokine, 2015.
20. Taylor, S.L., et al., *Genomic organization of the interleukin-1 locus*. Genomics, 2002. **79**(5): p. 726-33.
21. Nicklin, M.J., et al., *A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster*. Genomics, 2002. **79**(5): p. 718-25.

## Literaturverzeichnis

22. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 89-102.
23. Chen, C.J., et al., *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 851-6.
24. Kurt-Jones, E.A., et al., *Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 1204-8.
25. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105): p. cm1.
26. Dunican, E.M. and J.V. Fahy, *The Role of Type 2 Inflammation in the Pathogenesis of Asthma Exacerbations*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12 Suppl 2**: p. S144-9.
27. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
28. Hsu, C.L., C.V. Neilsen, and P.J. Bryce, *IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e11944.
29. Roussel, L., et al., *Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket*. EMBO Rep, 2008. **9**(10): p. 1006-12.
30. Cayrol, C. and J.P. Girard, *The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(22): p. 9021-6.
31. Dunne, A. and L.A. O'Neill, *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense*. Sci STKE, 2003. **2003**(171): p. re3.
32. Liu, X., et al., *Structural insights into the interaction of IL-33 with its receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(37): p. 14918-23.
33. Palmer, G., et al., *The IL-1 receptor accessory protein (AcP) is required for IL-33 signaling and soluble AcP enhances the ability of soluble ST2 to inhibit IL-33*. Cytokine, 2008. **42**(3): p. 358-64.
34. P., E., *Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocythen*. Arch Anat Physiol., 1879: p. p. 166-169.
35. P., E., *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung; These*. Leipzig: 1878.
36. Falcone, F.H., H. Haas, and B.F. Gibbs, *The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4028-38.
37. Sherri Wick, C.a.I. [Web Page] 13.11.2017 13.11.2017]; Available from: <http://www2.nau.edu/~fpm/immunology/blood.html>.
38. Gurish, M.F. and K.F. Austen, *The diverse roles of mast cells*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. F1-5.
39. Arock, M., et al., *Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(4): p. 557-64.
40. Kepley, C.L., et al., *The identification and characterization of umbilical cord blood-derived human basophils*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(4): p. 474-83.

41. Zheng, X., et al., *Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways*. *Immunology*, 2002. **107**(3): p. 306-15.
42. Kinet, J.P., *The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 931-72.
43. Kawakami, T. and S.J. Galli, *Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(10): p. 773-86.
44. Falcone, F.H., D. Zillikens, and B.F. Gibbs, *The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity*. *Exp Dermatol*, 2006. **15**(11): p. 855-64.
45. Suzukawa, M., et al., *An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor*. *J Immunol*, 2008. **181**(9): p. 5981-9.
46. Kay, A.B., *The early history of the eosinophil*. *Clin Exp Allergy*, 2015. **45**(3): p. 575-82.
47. Reinhardt, C. and A.S. Travis, *Heinrich Caro and the creation of modern chemical industry*. *Chemists and chemistry*. 2000, Dordrecht ; Boston: Kluwer Academic Publishers. xxii, 453 p.
48. Rosenberg, H.F., S. Phipps, and P.S. Foster, *Eosinophil trafficking in allergy and asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **119**(6): p. 1303-10; quiz 1311-2.
49. Hogan, S.P., et al., *Eosinophils: biological properties and role in health and disease*. *Clin Exp Allergy*, 2008. **38**(5): p. 709-50.
50. Davoine, F. and P. Lacy, *Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 570.
51. Fulkerson, P.C. and M.E. Rothenberg, *Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond*. *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(2): p. 117-29.
52. George, L. and C.E. Brightling, *Eosinophilic airway inflammation: role in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. *Ther Adv Chronic Dis*, 2016. **7**(1): p. 34-51.
53. Lewis, R.A., et al., *Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE*. *J Immunol*, 1982. **129**(4): p. 1627-31.
54. Mesquita-Santos, F.P., et al., *Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin*. *J Immunol*, 2006. **176**(3): p. 1326-30.
55. Cherry, W.B., et al., *A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils*. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(6): p. 1484-90.
56. Suzukawa, M., et al., *Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils*. *Lab Invest*, 2008. **88**(11): p. 1245-53.
57. Johnston, L.K., et al., *IL-33 Precedes IL-5 in Regulating Eosinophil Commitment and Is Required for Eosinophil Homeostasis*. *J Immunol*, 2016. **197**(9): p. 3445-3453.
58. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. *Immunol Today*, 1992. **13**(1): p. 11-6.
59. Yazdi, A.S., et al., *Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through*

- release of IL-1alpha and IL-1beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19449-54.
60. Pinkerton, J.W., et al., *Inflammasomes in the lung*. Mol Immunol, 2017. **86**: p. 44-55.
61. Smithgall, M.D., et al., *IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells*. Int Immunol, 2008. **20**(8): p. 1019-30.
62. Borthwick, L.A., *The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung*. Semin Immunopathol, 2016. **38**(4): p. 517-34.
63. Smith, D.E., *IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma*. Clin Exp Allergy, 2010. **40**(2): p. 200-8.
64. Chow, J.Y., et al., *Intracellular signaling mechanisms regulating the activation of human eosinophils by the novel Th2 cytokine IL-33: implications for allergic inflammation*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(1): p. 26-34.
65. Yoshimoto, T. and K. Matsushita, *Innate-type and acquired-type allergy regulated by IL-33*. Allergol Int, 2014. **63 Suppl 1**: p. 3-11.
66. Baumann, A., et al., *IgE-dependent activation of human mast cells and fMLP-mediated activation of human eosinophils is controlled by the circadian clock*. Mol Immunol, 2015. **64**(1): p. 76-81.
67. He, S.H., et al., *Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(10): p. 1270-83.
68. Yamaguchi, M., et al., *Human basophils and cytokines/chemokines*. Allergol Int, 2009. **58**(1): p. 1-10.
69. Pecaric-Petkovic, T., et al., *Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33*. Blood, 2009. **113**(7): p. 1526-34.
70. Nakae, S., et al., *Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy*. Allergol Int, 2013. **62**(1): p. 13-20.
71. Bae, S., et al., *Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity*. J Biol Chem, 2012. **287**(11): p. 8205-13.
72. Hodzic, Z., et al., *IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory*. Cytokine, 2017. **100**: p. 1-10.
73. Yoshimoto, T., et al., *IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13962-6.
74. Fux, M., et al., *IL-33 is a mediator rather than a trigger of the acute allergic response in humans*. Allergy, 2014. **69**(2): p. 216-22.
75. Karlen, S., et al., *Biological and molecular characteristics of interleukin-5 and its receptor*. Int Rev Immunol, 1998. **16**(3-4): p. 227-47.

## Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

### 8. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Hautklinik/ Forschungsbereich Allergologie und angeborene Immunität unter Betreuung von Privatdozent Dr. med. Amir Yazdi durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. phil. nat. Jürgen Brück, Julia Holstein, Tabea Anna Maier, Ingrid Kumbier und Dr. med. Katharina Meier) von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 04.09.2018

## Danksagung

### 9. Danksagung

Ich danke ganz besonders Herrn Privatdozent Dr. med. Amir Yazdi, meinem Doktorvater, für seine stete Geduld, Motivation und unbegrenzte Hilfe bei der Betreuung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. med. Katharina Meier, Dr. phil. nat. Jürgen Brück und Julia Holstein, die nicht nur im Labor immer zur Stelle waren sondern auch eine große Hilfe bei der Verwirklichung dieser Arbeit waren.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich nicht nur auf meinem Weg durch das Studium begleitet hat.