

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor der Klinik: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

Charakterisierung der Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) Rezeptor Expression und Signaltransduktion auf Monozyten und Monozyten-Zelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maryam Abu-Nahia

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Marc Jacobsen

Zweitgutachterin: PD Dr. Doreen Floß

Zusammenfassung

Monozyten sind die Blut-Vorläuferzellen von Makrophagen, welche eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Infektionen und bei der Entstehung von Immunpathologien, wie entzündlichen Erkrankungen, einnehmen. Initiale Studien beschreiben eine Rolle der Interleukin-7 Rezeptor alpha (IL-7R α) Ketten Regulation auf Monozyten bei entzündlichen Erkrankungen. Die IL-7R α Kette bildet zusammen mit der Thymic Stromal Lymphopoietin Rezeptorkette (TSLPR) den TSLPR Komplex. Vor diesem Hintergrund erscheint sowohl ein IL-7 als auch ein TSLP abhängiger Effekt auf Monozyten als Mechanismus bei der Entstehung von Immunpathologien möglich.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression der TSLPR und IL-7R α Ketten nach *in vitro* Stimulation von humanen Monozyten zu charakterisieren und die Signaltransduktion auf Monozyten und Monozyten-Zelllinien zu charakterisieren.

Hierzu wurden primäre Monozyten und MonoMac-Zelllinien *in vitro* nach Stimulation auf die Expression der IL-7R α und TSLPR Ketten mittels Durchflusszytometrie untersucht. Darüber hinaus wurden die Zellen mit TSLP bzw. IL-7 stimuliert, um die Signaltransduktion mittels Western Blot und Durchflusszytometrie zu vergleichen.

Es wurde eine Hochregulation beider Rezeptorketten nach Aktivierung, sowie eine Koexpression der IL-7R α Ketten auf TSLPR positiven primären Monozyten detektiert. Nach *in vitro* Stimulation mit IL-7 zeigte sich eine im Verhältnis zur Proportion IL-7R α positiver Monozyten geringe STAT5-Phosphorylierung, während TSLP STAT5 Phosphorylierung in TSLPR positiven Monozyten induzierte. Um die Frage zu beantworten, warum ein großer Anteil IL-7R α positiver Monozyten keine messbare STAT5 Phosphorylierung in Anwesenheit von IL-7 zeigte, wurden lentiviral transduzierte IL-7R α positive THP1-Zellen mit IL-7 bzw. TSLP stimuliert. Interessanterweise war auf diesen IL-7R α überexprimierenden THP-1 Zellen keine STAT5 Phosphorylierung in Anwesenheit von IL-7 zu detektieren. Im Gegensatz hierzu induzierte TSLP pSTAT5 in IL-7R α -positiven THP1-Zellen trotz geringer TSLPR Expression. Diese Ergebnisse zeigten einen Einfluss der IL-7R α Hochregulation nach Aktivierung auf die Sensitivität von Monozyten für TSLP, nicht aber für IL-7.

Abstract

Monocytes are the precursor cells of macrophages, which play an important role in the defense against infections and in the development of immunopathologies such as inflammatory diseases. Initial studies describe a role of interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α) chain regulation on monocytes in inflammatory diseases. Together with the thymic stromal lymphopoietin receptor chain (TSLPR), the IL-7R α chain forms the TSLPR complex. Against this background, both an IL-7 and a TSLP-dependent effect on monocytes appears to be a possible mechanism in the development of immunopathologies.

The aim of this work is to characterize the expression of TSLPR and IL-7R α chains after *in vitro* stimulation of human monocytes and to characterize the signal transduction on monocytes and monocyte cell lines.

For this purpose, primary monocytes and MonoMac cell lines were analyzed *in vitro* after stimulation for the expression of IL-7R α and TSLPR chains by flow cytometry. In addition, cells were stimulated with TSLP and IL-7, respectively, to compare signal transduction by Western blot and flow cytometry.

An upregulation of both receptor chains after activation as well as a co-expression of the IL-7R α chains on TSLPR positive primary monocytes was detected. After *in vitro* stimulation with IL-7, STAT5 phosphorylation was found to be low relative to the proportion of IL-7R α positive monocytes, whereas TSLP induced STAT5 phosphorylation in TSLPR positive monocytes. To answer the question why a large proportion of IL-7R α positive monocytes showed no measurable STAT5 phosphorylation in the presence of IL-7, lentivirally transduced IL-7R α positive THP1 cells were stimulated with IL-7 or TSLP. Interestingly, no STAT5 phosphorylation was detected on these IL-7R α overexpressing THP-1 cells in the presence of IL-7. In contrast, TSLP induced pSTAT5 in IL-7R α -positive THP1 cells despite low TSLPR expression.

These results showed an influence of IL-7R α upregulation after activation on the sensitivity of monocytes for TSLP, but not for IL-7.

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
γ C	<i>common</i> gamma Kette
μ l	Mikroliter
%	Prozent
$^{\circ}$ C	Grad Celcius
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
Et. Al	und andere
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fetal bovine serum
FoxO1	Forkhead box Protein
FSC-A	Forward Scatter-Area
FSH-H	Forward Scatter-Height
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GM CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde(n)
IL	Interleukin
IL-7	Interleukin 7
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar

MM1	MonoMac 1
MM6	MonoMac 6
ng	Nanogramm
Pam3	Pam3CysSerLys4
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
pSTAT5	phosphoryliertes STAT5
RT	Raumtemperatur
SDS Page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SSC-A	<i>Side Scatter-Area</i>
STAT5	<i>Signal Transducers and Activation of Transduction</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TSLP	Thymic Stromal Lymphopietin
TSLPR	Thymic Stromal Lymphopietin Rezeptor
tSNE	<i>t-distributed stochastic neighbour embedding</i>
U	<i>Unit</i>
unstim	<i>unstimulated, unstimuliert</i>
VC	<i>vector control</i>
Via	<i>Viability dye</i>
Vs	versus

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Monozyten und Makrophagen</i>	1
1.2	<i>Aufbau und Signaltransduktion des TSLPR und IL-7R</i>	3
1.3	<i>Expression und Regulation des TSLPR Komplexes auf Monozyten und Makrophagen</i>	4
1.4	<i>Rolle von TSLP und IL-7 auf Monozyten und Makrophagen in der Immunantwort</i>	5
1.5	<i>Immunopathologische Einflüsse</i>	7
1.6	<i>Zielsetzung</i>	8
2	Material und Methoden	9
2.1	<i>Material</i>	9
2.1.1	Geräte und Equipment	9
2.1.2	Verbrauchsmaterial.....	10
2.1.3	Chemikalien/Kits.....	11
2.1.4	Puffer.....	12
2.1.5	Medien	13
2.1.6	Antikörper	13
2.1.7	Software	15
2.2	<i>Methoden</i>	15
2.2.1	Ethikvotum.....	15
2.2.2	PBMC-Isolation.....	15
2.2.3	Monozytenisolation	16
2.2.4	Zellkultur und Passagieren	17
2.2.5	Stimulation.....	17
2.2.6	FACS.....	18
2.2.7	Western Blot	19
2.2.8	Statistik/Datenanalyse.....	21
3	Ergebnisse	22
3.1	<i>Phänotypisierung stimulierter Monozyten</i>	22
3.2	<i>Induzierte STAT5 Phosphorylierung und Verhältnis von pSTAT5 zur TSLPR/IL-7Rα Expression in primären Monozyten</i>	26

3.3	<i>MonoMac 1 / MonoMac 6: Induzierte TSLPR/IL-7Rα Expression und TSLP/IL-7 induzierte STAT5 Phosphorylierung.....</i>	32
3.4	<i>THP-1 Zellen: Induzierte TSLPR/IL-7Rα Expression und TSLP/IL-7 induzierte STAT5 Phosphorylierung.....</i>	35
4	Diskussion.....	38
4.1	<i>Die simultane Hochregulation der TSLPR- und IL-7Rα-Kette nach Stimulation ist zentral für die TSLP-Antwort in einer kleinen Subpopulation von Monozyten.....</i>	38
4.2	<i>IL-7Rα positive Monozyten und Monozyten-Zelllinien reagieren nicht oder nur zu einem kleinen Teil auf IL-7.....</i>	40
4.3	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</i>	44
5	Literatur und Quellenverzeichnis.....	46
6	Anhang.....	52
7	Danksagung.....	1

1 Einleitung

1.1 Monozyten und Makrophagen

Monozyten und Makrophagen gehören zur myeloischen Zelllinie, die eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem spielen. Sie helfen bei der frühen Erkennung, der Phagozytose und Präsentation von Pathogenen für die Zellen der adaptiven Immunantwort. Für die Erkennung von Pathogenen besitzen Monozyten/Makrophagen sogenannte Mustererkennungsrezeptoren. Diese umfassen unter anderem die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Monozyten und Makrophagen reagieren auf mikrobielle Krankheitserreger, indem sie zur Erkennung von Pathogenen mit ihrem TLR-4 pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) wie bspw. Lipopolysaccharid (LPS) und Pam3 binden, was die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine provoziert (Gren & Grip, 2016). Weiterhin führt eine Stimulation von Monozyten zur Expression verschiedener Oberflächenmarker wie der alpha-Kette des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R α) (Al-Mossawi et al., 2019).

1.1.1 Monozyten-Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben primär isolierten Monozyten immortalisierte monozytäre Zelllinien verwendet.

Die genetische Homogenität der Zelllinien vermindert die Variabilität des Phänotyps der Monozyten (Chanput et al., 2015; Kaur & Dufour, 2012) und sorgt dafür, dass auch das *Signaling* der Zellen gleich abläuft. Man wirkt dem Problem der Kontamination mit anderen Zellen (z.B. Lymphozyten) entgegen, die Experimente und Analysen werden dadurch besser reproduzier- und vergleichbar. Außerdem sind sie im Gegensatz zu Primärmonozyten, die i. d. R eine Lebensdauer von ein bis drei Tagen aufweisen (Yona & Jung, 2010), im Stande, sich unbegrenzt zu vermehren, sind robuster und einfacher zu handhaben.

Die Ergebnisse der Primärzellen lassen sich somit mit denen der Monozyten Zelllinien vergleichen und möglicherweise bestätigen. THP-1 Zellen, MonoMac 1 und MonoMac 6 wurden als Zelllinien für die Experimente in der vorliegenden Arbeit verwendet.

THP-1 Zellen

THP-1-Zellen ähneln in Morphologie und Differenzierungseigenschaften primären Monozyten und Makrophagen. Sie weisen eine große, runde Einzelzellmorphologie auf und exprimieren monozytäre Marker. Die THP-1 Zelllinie wurde aus dem Blut eines Patienten mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen und wurde 1980 von Tsuchiya et al. (Tsuchiya et al., 1980) etabliert (Chanput et al., 2015). Mohammed Rizwan (*Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, Düsseldorf*) hat unserer Arbeitsgruppe die THP-1 Zelllinie bereitgestellt.

Transduzierte THP-1 Zellen: IL-7R α positive Zellen und Vektorkontrolle

Unsere Arbeitsgruppe Jacobsen etablierte eine IL-7R α transduzierte THP-1 Zelllinie, die den IL-7R α konstitutiv auf der Zelloberfläche überexprimiert (im Folgenden auch „cDNA-Zellen“), und eine entsprechende Vektorkontrolle.

THP-1 Zellen wurden mittels lentiviralen Überständen und einem LeGO-*Backbone* Konstrukt, welches *Green fluorescent protein* (GFP) kodiert, modifiziert. Dabei wurde für die transduzierte Linie eine IL-7R α exprimierende Gensequenz in den *Backbone* eingefügt, die Vektorkontrolle wurde ohne diese Sequenz etabliert und ist somit IL-7R α negativ (Masterarbeit „Charakterisierung der Interleukin-7 Rezeptor Expression und Regulation unter Verwendung humaner Monozyten-Zelllinien“ von Sabine Hellmuth, 2021).

MonoMac 1 und 6

1985 wurde die elterliche Zelllinie MonoMac aus einer Blutprobe eines 60-jährigen Patienten mit der Diagnose einer akuten monoblastischen Leukämie etabliert (Ziegler-Heitbrock et al., 1988). Morphologische, zytochemische und immunologische Kriterien stimmen mit denen reifer Monozyten überein.

1.2 Aufbau und Signaltransduktion des TSLPR und IL-7R

Der *Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor* (TSLPR) oder auch in der Literatur zu finden als *Cytokine receptor-like factor 2* (CRLF2) (Tal et al., 2014) ist ein Protein, das eng mit der Zytokinrezeptor-Untereinheit γ_c (*common gamma chain*) verwandt ist und als Monomer TSLP mit geringer Affinität bindet (Park et al., 2000; Quentmeier et al., 2001). Als Heterodimer mit der α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R α) bindet die TSLPR Kette TSLP mit hoher Affinität (Leonard, 2002; Pandey et al., 2000; Reche et al., 2001) (Abb. 1). TSLPR wird von unterschiedlichen Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, ILC2 (*type 2 innate lymphoid cells*), NK-Zellen, Monozyten, Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen und dendritischen Zellen sowie von nicht-hämatopoetischen Zelllinien wie Epithelzellen (Allakhverdi et al., 2007; Ziegler, 2010) exprimiert und spielt eine Rolle bei der Immunregulation, Typ 2 Inflammation sowie bei malignen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen (Corren & Ziegler, 2019; Ziegler et al., 2013).

Bei TSLP-Bindung kommt es zur Zusammenlagerung des TSLPR/IL-7R α Komplexes und zur Phosphorylierung des JAK1 (über die IL-7R α -Kette) und JAK2 Proteins (über die TSLPR-Kette). pJAK1 und pJAK2 führen anschließend zur Tyrosin-Phosphorylierung von *Signal Transducer and Activator of Transcription 5A* (STAT5A) und STAT5B, welche im aktivierten Zustand im Zellkern als Transkriptionsfaktor fungieren und letztlich die Produktion von IL-4, IL-5, und IL-13 sowie entzündungsfördernde Effekte bewirken (Rochman et al., 2010). Andere Autoren berichten ebenfalls von einer Aktivierung weiterer STAT-Proteine wie STAT1 und 3 (Arima et al., 2010; Lu et al., 2009; Reche et al., 2001).

Der IL-7R setzt sich zusammen aus der α -Kette des IL-7R und dem auch von weiteren Zytokinen genutzten common-gamma (γ_c) Rezeptor (Abb. 1).

Bei der Interaktion von IL-7 werden die extrazellulären Einheiten der Rezeptoren zu einem heterodimeren Komplex (IL-7R α / γ_c) vernetzt. Die Dimerisierung führt zur gegenseitigen Phosphorylierung von JAK1 und JAK3, was eine Andockstelle für das Signalmolekül STAT5 schafft. Das phosphorylierte STAT5 dimerisiert und wandert für die Gentranskription in den Zellkern (Barata et al., 2019; Mazzucchelli & Durum, 2007).

TSLP und IL-7 nutzen somit gemeinsame Signalwege und könnten überlappende Wirkungen auf Immunzellen haben, da beide die IL-7R α Kette zur Signalübertragung nutzen.

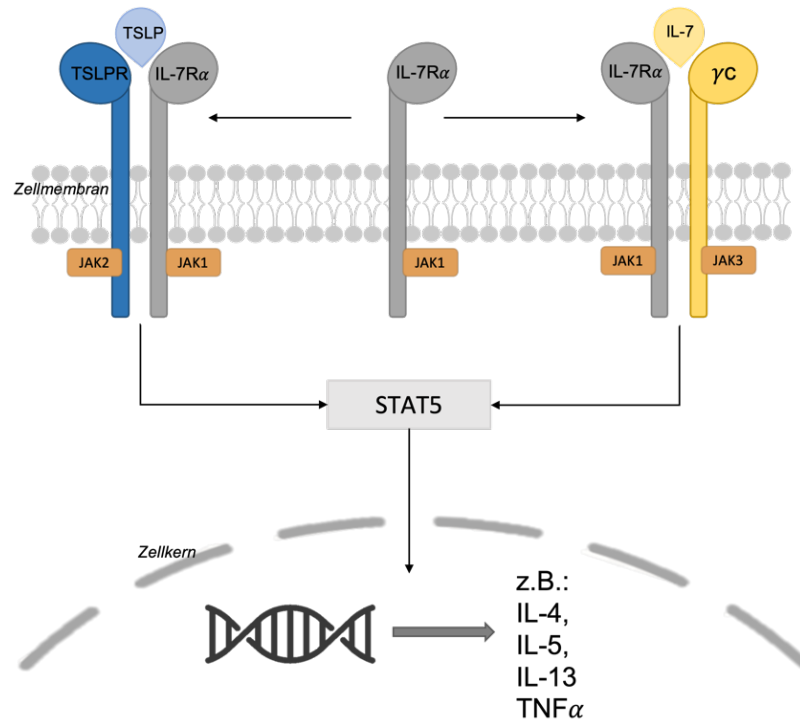


Abb. 1: **Schematische Darstellung des TSLPR Komplexes und IL-7R und Signaltransduktion durch ihre jeweilige Rezeptor-Heterodimerisierung bei Zytokinbindung.**

TSLP und IL-7 signalisieren über heterodimere Rezeptoren, die sich die IL-7R α -Rezeptorkette teilen. TSLP interagiert zunächst mit der TSLPR-Kette und verstärkt so die Rekrutierung von IL-7R α und die Bildung eines extrazellulären ternären Komplexes. IL-7 bildet mit IL-7R α und dem γ C einen heterodimeren Rezeptorkomplex, der zur Aktivierung der JAK/STAT Proteine führt.

1.3 Expression und Regulation des TSLPR Komplexes auf Monozyten und Makrophagen

Während die Expression, Regulation und Funktion des TSLPR/IL-7R α -Komplexes auf dendritischen Zellen und Lymphozyten bereits umfassender beschrieben ist, ist noch wenig über die Expression und Regulation auf Monozyten bzw. Monozyten-Zelllinien und Makrophagen bekannt.

Im Gegensatz zu T-Zellen exprimieren ruhende Monozyten nur moderate Mengen an IL-7R α (Adankwah et al., 2021), unter entzündlichen Bedingungen und stimulationsbedingt jedoch exprimieren Monozyten und Monozyten-abgeleitete Makrophagen (MDMs) hohe IL-7R α -Spiegel (Al-Mossawi et al., 2019; Kim et al., 2020).

Ähnlich verhält es sich für die TSLPR-Kette; die Expression und Regulation der TSLPR Kette auf menschlichen Monozyten ist nur wenig erforscht, einige Quellen beschreiben eine geringe konstitutive TSLPR Expression auf Monozyten und Makrophagen (Braile et al., 2021; Reche et al., 2001; Ziegler et al., 2013). Die Arbeitsgruppe von Borriello et al. konnte zeigen, dass frisch isolierte Monozyten nach Stimulation mit LPS zu einem signifikanten Prozentsatz die Expression des TSLPR Komplexes hochregulieren. Dies konnte klinisch an septischen Patienten bestätigt werden, denn isolierte Monozyten von Patienten im Rahmen der Entzündung wiesen im Vergleich zu Gesunden erhöhte TSLPR- und IL-7R α -mRNA-Konzentrationen auf (Borriello et al., 2017; Shalova et al., 2015).

Mechanismen, die der Regulation der TSLPR/IL-7R α -Expression in Monozyten zugrunde liegen, sind bisher unzureichend definiert.

Zur IL-7R α -Regulierung in T-Zellen weiß man, dass die Transkription der Rezeptorkette vom Forkhead-Box-O-1-Transkriptionsfaktor (FoxO1) abhängt, einem Transkriptionsfaktor, der an den IL7RA-Promotor bindet und die IL-7R α mRNA-Expression induziert (Kerdiles et al., 2009).

In Monozyten jedoch wird FoxO1 konstitutiv exprimiert und zeigt keine Veränderung der Expression bei *in vitro* Stimulation (Harelimana et al., 2022).

1.4 Rolle von TSLP und IL-7 auf Monozyten und Makrophagen in der Immunantwort

TSLP wurde aus einer Thymus-Stromazelllinie der Maus isoliert und ähnelt strukturell dem Interleukin 7 (Friend et al., 1994). Die Funktionen von TSLP und IL-7 auf Monozyten sind noch weitgehend ungeklärt (Adankwah et al., 2021; Borriello et al., 2017).

Anfangs wurde TSLP als Faktor für B-Zell Aktivierung und Proliferation deklariert (Friend et al., 1994; Milford et al., 2016; Ray et al., 1996; Sims et al., 2000). Später gewann der Effekt des Zytokins auf dendritischen Zellen (DC) in der Literatur mehr an Bedeutung und wurde intensiv erforscht. Insgesamt lässt sich TSLP eine funktionale Bedeutung bei der Typ-2 Entzündung zuschreiben.

So wurde gezeigt, dass TSLP DCs zur Expression des OX40-Liganden (OX40L), CD80 und CD86 anregt, die die Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) Produktion sowohl bei TH1- als auch bei TH2-Zellreaktionen fördern (Arima et al., 2010; Ito et al., 2005).

TSLP-aktivierte DCs im Thymusmark unterstützen die Bildung von regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Zellen. Im Gewebe sezernieren sie als antigenpräsentierende Zellen TH2-zellanziehende Chemokine und fördern die TH2-Zellpolarisierung von CD4+ T-Zellen (Leichner et al., 2017; Liu et al., 2007; Watanabe et al., 2005), die Typ-2-Zytokine wie IL-4, IL-5, IL13 produzieren (Ito et al., 2005; Liu, 2006).

Über den Effekt von TSLP auf Monozyten weiß man, dass die Stimulation mit TSLP zur Induktion von thymusaktivitätsreguliertem Chemokin (TARC/CCL17), pulmonärem und aktivitätsreguliertem Chemokin (PARC/CCL18) und Makrophagen-abgeleitetem Chemokin (MDC/CCL22) führt. Diese Chemokine binden an den CCR4-Rezeptor auf T-Zellen und locken somit Effektorzellen des TH2-Phänotyps an. (Borriello et al., 2017; Reche et al., 2001).

IL-7 aktiviert sowohl das erworbene als auch das angeborene Immunsystem, die Rolle von IL-7 bei der Entwicklung von Monozyten ist noch weitgehend ungeklärt (Al-Mossawi et al., 2019).

Bisher weiß man, dass IL-7 die Sekretion von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, Makrophagen-Entzündungsprotein β (MIP-1 β) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) durch humane Monozyten induziert (Hartgring et al., 2006; Standiford et al., 1992).

Eine erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose, Typ-1-Diabetes oder rheumatoider Arthritis wurde mit abweichender Expression des IL-7R α in Verbindung gebracht (Bai et al., 2019; Chen et al., 2013; Lundmark et al., 2007; Lundtoft et al., 2017; Marković & Savvides, 2020).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Monozyten von Tuberkulosepatienten eine beeinträchtigte IL-7 Reaktion und eine geringere IL-7 Rezeptordichte aufweisen (Adankwah et al., 2021), jedoch stellten Harelimana et al. eine Hochregulierung des IL-7R α bei Referenzmonozyten fest, wenn diese mit Serumproben von Patienten mit aktiver Tuberkulose stimuliert wurden (Harelimana et al., 2022).

Zhang et al. beschreibt in einem aktuellen Paper, dass IL-7R α eine funktionelle Heterogenität unter den Monozytenreaktionen in einer Entzündung prägt. So fanden sie bei Patienten mit COVID-19 und rheumatoider Arthritis eine Untergruppe von IL-7R α positiven Monozyten und Makrophagen, die in den hochentzündlichen Gewebeerwartungen hypoinflammatorische Phänotypen beibehielten und somit einen günstigen Krankheitsverlauf vorhersagen (Zhang et al., 2022).

1.5 Immunopathologische Einflüsse

TSLP wurde anfänglich mit allergischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (z. B. atopische Dermatitis, Bronchialasthma, allergische Rhinitis, eosinophile Ösophagitis). Bei diesen Krankheiten sind v.a. entzündliche Zytokine vom TH2-Typ und erhöhte IgE-Werte beteiligt. Aber auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen (z. B. chronisch obstruktive Lungenerkrankung und entzündliche Darmerkrankung), Autoimmunerkrankungen (z. B. Psoriasis, rheumatoide Arthritis) sowie bei verschiedenen Krebsarten spielt TSLP eine wichtige Rolle (Soumelis et al., 2002; Zhou et al., 2005; Ziegler, 2010). Ein aktuelles Paper von (Choa et al., 2021) berichtet von Funktionen des Zytokins, die über pathologische Entzündungen hinausgehen: Aufrechterhaltung der gesunden Hautbarriere, Talgsekretion und Regulierung des Immunstoffwechsels. Die Forschung am TSLP-Rezeptorkomplex und TSLP-Zytokin ist deshalb von Relevanz, weil diese zum einen Funktion und Rolle der IL-7R α Kette weiter aufschlüsseln kann, zum anderen könnten TSLPR und TSLP als Zielstrukturen zur Therapie z.B. atopischer und allergischer Erkrankungen dienen oder als prädiktive Marker für die Einschätzung des Schweregrads einer Krankheit zunutze sein. So wurde bereits der monoklonale Antikörper Tezepelumab, der das TSLP bindet und somit die

Rezeptorinteraktion inhibiert, von den USA im Dezember 2021 und seit September 2022 auch in Deutschland zur ergänzenden Erhaltungstherapie gegen schweres, unkontrolliertes Asthma bei Patienten ab 12 Jahren zugelassen (Corren, 2019; Corren et al., 2021; Corren et al., 2017; Diver et al., 2021; Gillissen, 2022). Weitere Arzneimittel gegen den TSLP-Rezeptor werden entwickelt und erforscht (Numazaki et al., 2022).

1.6 Zielsetzung

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese beinhaltet die deutliche Hochregulierung des IL-7R α auf humanen Monozyten und Makrophagen nach Stimulation (Al-Mossawi et al., 2019).

Ziel der Arbeit ist es, die stimulations-induzierte TSLPR Expression im Kontext der IL-7R α Ketten Regulation bei humanen Monozyten und Monozyten-Zelllinien zunächst zu charakterisieren und anschließend die Effekte von TSLP und IL-7 auf die Signaltransduktion in primären Monozyten und Monozyten-Zelllinien zu beschreiben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden werden alle verwendeten Materialien aufgelistet.

2.1.1 Geräte und Equipment

Tabelle 1: verwendetes Equipment und Geräte

Equipment/Gerät	Firma
FACS LSR Fortessa	BD Biosciences
Kühlschrank (4°C) und Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr
Freezer (-80°C) TSX Series V-drive	ThermoFisher
Flake Ice Maker SPR 80 W	NordCap
Mr. Frosty Gefrierbehälter	ThermoFisher Scientific
Heracell VIOS 160i CO2-Incubator	Thermo Fisher Scientific
Light microscope Olympus CK40-F200	Olympus
Neubauer Counting chamber	Marienfeld
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich
Centrifuge Fresco 17	Heraeus
Multichannel Pipette ErgoOne® 0,5-10µl	StarLab
Multichannel Pipette ErgoOne® 30-300µl	StarLab
Finnpipette F1 Multichannel Pipette 5-50µl	Thermo Fisher Scientific
Pipette Controller Pipetboy	Integra
Research® Pipette 0,1-2,5µl	Eppendorf
Research® Pipette 0,5-10µl	Eppendorf
Research® Pipette 10-100µl	Eppendorf
Research® Pipette 20-200µl	Eppendorf
Research® Pipette 100-1000µl	Eppendorf
Single Pipette ErgoOne® 0,1-2,5µl	StarLab
Single Pipette ErgoOne® 0,5 - 10µl	StarLab
Single Pipette ErgoOne® 2 - 20µl	StarLab
Single Pipette ErgoOne® 20 - 200µl	StarLab
Single Pipette ErgoOne® 100 - 1000µl	StarLab

Equipment/Gerät	Firma
Wasserbad Welabo	Köttermann Labortechnik
Platten Reader Infinite® M200	Tecan
ChemiDoc Touch Imagine System	BioRad
Novex Mini Cell	Invitrogen
Trank transfer system unit TE22	Hoefler
Kühlsystem	Biometra
Power Supply Model 1000/500	BioRad

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabella 2: *verwendetes Verbrauchsmaterial*

Verbrauchsmaterial	Firma
Graduated Filter Tips 10µl	StarLab
Graduated Filter Tips 20µl	StarLab
Graduated Filter Tips 200µl	StarLab
Graduated Filter Tips 1000µl	StarLab
Bevelled Tips, refill 10µl	StarLab
Bevelled Tips, refill 200µl	StarLab
Bevelled Tips, refill 1000µl	StarLab
Cell culture Microplate 96 Well U-Bottom plates	Greiner Bio-One
Abdeckung, 9mm, sterile	Greiner Bio-One
24 Well CytoOne® Platte, TC-behandelt	StarLab
Nunc MaxiSorp 96 well plate	ThermoFisher
Plate Sealer	ThermoFisher
Corning® Costar® Stripette® serological pipettes 5ml	Corning
Corning® Costar® Stripette® serological pipettes 10ml	Corning
Corning® Costar® Stripette® serological pipettes 25ml	Corning
Biobanking and Cell Culture Cyrogenic Tubes 1ml Nunc™	ThermoFisher Scientific
Falcon 50ml Conical Centrifuge Tubes	ThermoFisher Scientific
Falcon 15ml Conical Centrifuge Tubes	ThermoFisher Scientific
Microdilution Tube 1,2ml	StarLab
Biosphere® SafeSeal Tube 1,5ml	Sarstedt
Safe-Lock microcentrifuge Tubes 0,5ml	Eppendorf
Safe-Lock microcentrifuge Tubes 2,0ml	Eppendorf
Vacutainer® Li-Heparin Blood Collection Tubes 6ml	BD Biosciences
NuPage 4-12% Bis-Tris-Gel, 10 wells	Invitrogen

Verbrauchsmaterial	Firma
Whatman Paper	GE Healthcare
Nitrocellulose Membrane, 2µm	BioRad
Immun-Blot PVDF Membrane for Protein Blotting	BioRad
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Falcon
CELLSTAR® Zellkulturflasche, 50ml, 25cm ² , PS, Filter-Schraubverschluss rot, steril	Greiner Bio-One
StarTub Reagenzienreservoir aus PVC	StarLab
StarTub PS Reagenzienreservoir, 55 ml, einzeln verpackt, steril	StarLab
Petri Schale	Sarstedt

2.1.3 Chemikalien/Kits

Tabelle 3: *verwendete Chemikalien/Kits*

Chemikalie/Kit	Firma
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi
Histopaque-1077 Hybri-Max (Ficoll)	Sigma-Aldrich
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Gibco
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
HEPES (10mM)	Thermo Fisher Scientific
RPMI 1640 Medium, ohne Glutamin	Thermo Fisher Scientific
L-Glutamin (2mM)	Sigma Aldrich
<i>Insulin solution from bovine pancreas</i>	Sigma Aldrich
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution</i> (EDTA)	Sigma Aldrich
Dimethyl-Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
FACS Clean Solution	BD Biosciences
FACS Flow TM	BD Biosciences
FACS Rinse Solution	BD Biosciences
<i>Trypan Blue Solution, 0.4%</i>	Gibco
Lipopolysaccharid aus <i>Escherichia coli</i> O127:B8	Sigma-Aldrich
Pam3-Cys-OH (Pam3)	Sigma-Aldrich
PMA	Sigma-Aldrich

Chemikalie/Kit	Firma
<i>Human GM-CSF Recombinant Protein (GM-CSF)</i>	ThermoFisher Scientific
<i>IL-7 human</i>	Sigma-Aldrich
<i>Recombinant Human TSLP (carrier-free)</i>	BioLegend
Methanol	VWR
10x <i>Tris Buffered Saline (TBS)</i>	Cell signaling
Tween20	Sigma-Aldrich
<i>Skim Milk Powder</i>	Sigma-Aldrich
NuPage Antioxidant	Invitrogen
NuPage <i>Sample Reducing Agent 10x</i>	Invitrogen
NuPage <i>LDS Sample Buffer 4x</i>	Invitrogen
NuPage MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen
NuPage <i>Transfer Buffer (20x) Novex</i>	Invitrogen
Phosphatasehemmer-Cocktail 3	Sigma-Aldrich
Phosphatasehemmer	Sigma-Aldrich
<i>Re-blot Plus Strong Solution</i>	Sigma-Aldrich
<i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific
CellLytic	Sigma-Aldrich
Phosphataseinhibitor P8340	
Phosphataseinhibitor P0044	
<i>Precision Plus Protein All blue prestained Protein Standards</i>	BioRad
<i>Precision Plus Protein Dual Color Standards</i>	BioRad
<i>EasySep Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion</i>	STEMCELL
EasySep Magnet	STEMCELL
<i>True Nuclear Fixation buffer</i>	BioLegend

2.1.4 Puffer

Tabelle 4: *zubereitete Pufferlösungen*

Puffer	Beschreibung
1x TBS <i>Washing Buffer</i>	899ml Ampuwa, 100ml 10x TBS, 1ml Tween20
<i>Blocking Buffer</i>	5g Skim Milk Powder in 100ml 1x TBS Washing Buffer

Puffer	Beschreibung
MOPS SDS <i>Running Buffer</i>	950ml Ampuwa, 50ml 20x NuPage MOPS SDS Running Buffer
1x NuPage <i>Transfer Buffer</i>	749ml Ampuwa, 200ml Methanol, 50ml 20x NuPage Transfer Buffer, 1ml Antioxidant
Lysepuffer	1ml CellLytic, 10µl Proteasehemmer-Cocktail, 10µl Phosphatasehemmer-Cocktail 3
10x MACS <i>Buffer</i>	37,5ml DPBS, 10ml EDTA, 2,5ml BSA

2.1.5 Medien

Tabelle 5: *Zusammensetzung der verwendeten Medien*

Medium	Beschreibung
Monozytenmedium	43,5 ml RPMI 1640 Medium, 500 µl L-Glutamin, 500µl HEPES, 500µl P/S, 5ml FBS
MM6 Medium	43,45 ml RPMI 1640 Medium, 500 µl L-Glutamin, 500µl HEPES, 500µl P/S, 5ml FBS, 50µl Insulin
Monozyten-Isolationsmedium	1ml FBS, 0.1 ml of 0.5 mM EDTA, 48.9 ml PBS
Freezing medium	70% Monozytenmedium, 20% FBS, 10% DMSO

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 FACS Durchflusszytometer Antikörper

Tabelle 6: *verwendete Antikörper für durchflusszytometrische Messungen*

Antikörper	Klon	Firma
TSLP Receptor Monoclonal Antibody	1A6	Invitrogen
APC Mouse IgG2a kappa Isotype Control	eBM2a	Invitrogen
PE anti-human CD127 (IL-7Ra)	A019D5	Biologend
IgG1-PE isotype control	MOPC-21	Biologend

Antikörper	Klon	Firma
PE/Cyanine7 anti-human CD11b antibody	ICRF44	Biolegend
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD16	3G8	Biolegend
BV605 anti-human CD14	M5E2	Biolegend
PerCP/Cyanine 5.5 anti-human HLA-DR	L243	Biolegend
Phospho-STAT5 (Tyr694) Monoclonal Antibody	SRBCZX	Thermo Fisher Scientific

2.1.6.2 Western Blot Immunodetektion Antikörper

Tabelle 7: verwendete Antikörper für die Immunodetektion beim Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Klon	Spezies	Größe (kDA)	Hersteller
Jak2	1:1000 in 1x TBS	E4Y4D	Mouse	125	Cell signaling
Phospho-Jak2 (Tyr1008)	1:1000 in 1x TBS	D4A8	Rabbit	125	Cell signaling
Jak3	1:1000 in 1x TBS	D7B12	Rabbit	115	Cell signaling
Phospho-Jak3 (Tyr980/981)	1:1000 in 1x TBS	D44E3	Rabbit	115	Cell signaling
Stat5	1:1000 in 1x TBS	D2O6Y	Rabbit	90	Cell signaling
Phospho-Stat5 (Tyr694)	1:1000 in 1x TBS	D47E7	Rabbit	90	Cell signaling
ECL Anti mouse IgG Horseradish peroxidase	1:1000 in <i>blocking buffer</i>				GE Healthcare
ECL Anti rabbit IgG Horseradish peroxidase	1:1000 in <i>blocking buffer</i>				GE Healthcare
Monoklonales β -actin	1:1000 in 1x TBS	AC15	Mouse	42	Sigma-Aldrich

2.1.7 Software

Tabelle 8: *verwendete Software*

Software	Firma
FlowJo	Treestar, Inc.
GraphPad Prism	GraphPad
FACSDiva	BD Biosciences
EndNote	Alfasoft GmbH
Office: Word, Excel, Powerpoint	Microsoft

2.2 Methoden

In diesem Kapitel werden alle angewandten Methoden beschrieben.

2.2.1 Ethikvotum

Für diese Arbeit liegt das Ethikvotum 5445 vor, das die Verwendung mit Buffy Coats aus der Transfusionsmedizin miteinschließt.

2.2.2 PBMC-Isolation

Für die PBMC und Monozytenisolation wurden die *Buffy Coats* aus der Transfusionsmedizin des UKD abgeholt und sofort aufbereitet. Die ersten Schritte der Isolation erfolgen bei Raumtemperatur. Zunächst wurde 20ml des Bluts jeweils mit 30ml PBS in einem 50ml Falcon verdünnt und anschließend auf ein weiteres Röhrchen mit 12ml Ficoll (Histopaque) unter Vermeidung einer Vermischung geschichtet und zentrifugiert (30 min, RT, 1500 U/min ohne Bremse). Es entsteht eine Trennung vier verschiedener Phasen (von oben nach unten): Plasma (gelb), *Buffy Coat* (Schicht aus Leukozyten und Plättchen, grau), Ficoll (durchsichtig) und Erythrozyten (rot).

Alle darauffolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis (4°C) durchgeführt. Die graue Phase der PBMCs wurde mit einer 10ml Stripette in kreisenden Bewegungen abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Für den ersten Waschschrift wurde eiskaltes PBS hinzugefügt und zentrifugiert (15 min, 4°C, 1200 U/min mit Bremse). Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, wurde das Zellpellet mit 10 ml PBS

resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 1200 U/min mit Bremse). Schließlich konnten die Zellen nach Abnahme des Überstandes für weitere Stimulation oder Isolation in das entsprechende Medium überführt und gezählt werden.

2.2.3 Monozytenisolation

Für die Isolation der Monozyten aus den PBMCs wurde das *EasySep Human Monocyte Enrichment Kit without CD16 depletion* benötigt. 50 Millionen PBMCs wurden in 500µl Monozyten-Isolationsmedium in einem 5 ml *Polystyrene Round-Bottom Tube* resuspendiert und 30µl des *EasySep Human Monocyte Enrichment Cocktail without CD16 Depletion* hinzugefügt und gemixt. Nach 15 min Inkubationszeit bei 4°C wurde 30µl der *EasySep D Magnetic Particles for Human Monocytes* für 30 Sekunden gevortext, zu den PBMCs hinzugegeben und gemixt. 15 min wurden die Zellen erneut bei 4°C inkubiert und mit dem Isolationsmedium auf 2,5ml aufgefüllt, hierbei 2-3-mal vorsichtig resuspendiert. Das Röhrchen wurde für 2,5 min ohne Deckel in den Magneten gestellt. Letztlich wurde der Magnet samt Röhrchen in einer kontinuierlichen Bewegung umgedreht, wobei die angereicherten Monozyten in ein neues Röhrchen gegossen wurden.

2.2.4 Zellkultur und Passagieren

Die Zelllinien wurden in 50ml Zellkulturflaschen in warmem (37°C) Monozytenmedium (bzw. Mono Mac 6 in MM6 Medium) im Inkubator kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die Zellen subkultiviert, um für das Wachstum der Zellen ausreichend Platz und Nährstoff zu bieten. Dazu wurden die Zellen im Medium von den T50 Flaschen in 50ml Falcon Röhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 22°C, 1200 U/min). Der Überstand wurde abdekantiert und -pipettiert und das Zellpellet mit 1ml frischem Medium resuspendiert. Mit der Neubauer Zählkammer konnten die Monozyten pro Milliliter gezählt werden und in frische T50 Flaschen aufgeteilt werden. Die Flaschen wurden auf ca. 20-30ml mit Monozytenmedium aufgefüllt.

THP Zellen: Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 50ml Zellkulturflaschen kultiviert und zwei Mal pro Woche passagiert. Zur Kultivierung wurde Monozytenmedium genutzt.

Mono Mac 1 und 6: Mono Mac 1 Zellen (MM1, ACC 252, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH) und Mono Mac 6 (MM6, ACC 124, DSMZ) wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 50ml Zellkulturflaschen kultiviert und zwei Mal pro Woche passagiert. Zur Kultivierung wurde für MM1 Monozytenmedium und für MM6 Monozytenmedium mit Insulin (MM6 Medium) genutzt.

2.2.5 Stimulation

2.2.5.1 Mit PAMPs

Als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) wurden in dieser Arbeit das Lipopolysaccharid (1ng/ml) und Pam3 (100ng/ml) verwendet. GM-CSF (5ng/ml) diente als Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor der Monozyten. Für die Stimulation wurden in einer 96 well Platte 50.000 Monozyten pro well in Monozytenmedium mit dem entsprechenden Stimulus für 6h (pSTAT5 Experiment) oder 24h (Expressionsexperiment) bei 37°C 5% CO₂ inkubiert.

2.2.5.2 Mit TSLP und IL-7

Die Zytokine TSLP (0,1ng/ml, 1n/ml, 10ng/ml) und IL-7 (1ng/ml) wurden zur Vorbereitung in der entsprechenden Konzentration in Monozytenmedium gelöst und auf 37°C erwärmt. Nach der Aktivierung der Zellen für 6h mit LPS wurde das Medium samt Stimulation abzentrifugiert (5 min, RT, 1500 U/min) und die Zellpellets in 100µl Zytokinlösung mit einer Multichannel Pipette resuspendiert und inkubiert (15min, 37°C, 5% CO₂).

2.2.6 FACS

2.2.6.1 Färbung und Messen

Die Zellen in den Platten wurden nach der Inkubationszeit zentrifugiert (5min, RT, 1500 U/min) und der Überstand entfernt. Es wurde 160µl 1x MACS *Buffer* hinzugefügt und 20 min auf Eis inkubiert, um die Zellen, die sich an die Platte adhärirt haben, zu lösen. Die Platten wurden zentrifugiert (5min, 4°C, 1500 U/min), der Überstand abgenommen und 5µl des vorbereiteten Antikörpermix pro *well* hinzugefügt und intensiv resuspendiert. Nach 30min Inkubationszeit auf Eis im Dunkeln wurden die Zellen mit 160µl 1x MACS *Buffer* gewaschen und zentrifugiert (5min, 4°C, 1500 U/min). Zum Pellet wurden 100µl 1x MACS *Buffer* hinzugefügt und es konnte mit der durchflusszytometrischen Messung begonnen werden. Dazu wurde der Inhalte eines wells gemixt, in ein Mikrodilution *Tube* überführt, gevortext und mit dem FACS LSR Fortessa gemessen. Für Details der Gatingstrategie ist eine repräsentative Auswertung in Abb. 3 und Abb. 4 des Ergebnisteils dargestellt.

2.2.6.1.1 Färbung phosphorylierter STAT-Proteine

Für das Messen phosphorylierter intrazellulärer Proteine unterscheidet sich der Färbungsprozess in einigen Punkten, auf die im Folgenden eingegangen werden soll. Nach der Inkubation des Zytokins (TSLP oder IL-7) wurde zu den Zellen 100µl *True Nuclear Fixation buffer* hinzugegeben, mehrmals resuspendiert und inkubiert (15min, 37°C, 5% CO₂). Ab dem Zeitpunkt der Fixierung musste stets mit einer höheren Drehzahl (5min, 4°C, 1700 U/min) zentrifugiert und auf Eis gearbeitet

werden. Der Überstand wurde abgenommen, 130 μ l eiskaltes Methanol wurde hinzugefügt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 180 μ l von 10%FBS in PBS gewaschen (5min, 4°C, 1700 U/min) und es konnte wie oben beschrieben mit dem entsprechenden STAT-Antikörpermix gefärbt und (nach zwei Waschschritten mit 10%FBS in PBS) durchflusszytometrisch gemessen werden. Für Details der Gatingstrategie ist eine repräsentative Auswertung in Abb. 8 des Ergebnisteils dargestellt.

2.2.7 Western Blot

2.2.7.1 Stimulation

Für den Western Blot wurden pro Stimulationskondition 3×10^6 Zellen benötigt, die in Monozytenmedium auf eine 96 *well U-bottom* Platte mit jeweils 50.000 Monozyten pro *well* aufgeteilt wurden. Zuvor wurden die Zellen für 6h mit LPS (1ng/ml) aktiviert. Als Positivkontrolle wurden frisch isolierte PBMCs ohne Aktivierung verwendet. Zu einer Platte wurde nur Monozytenmedium ohne Zytokin hinzugegeben (unstimuliert), eine wurde mit TSLP (10ng/ml) und die dritte mit IL-7 (10ng/ml) je für 15min bei 37°C 5% CO₂ stimuliert.

2.2.7.2 Proteinisolation

Nach 15min Inkubationszeit wurde jede Stimulationskondition aus den Platten in je ein 15ml Falcon Röhrchen überführt. Diese wurden zentrifugiert (5min, 4°C, 1200 U/min), der Überstand entfernt und mit 1ml kaltem PBS resuspendiert, um die Zellen in 1,5ml Reaktionsgefäße zu überführen. Es folgten zwei Waschschrritte mit PBS (10 min, 4°C, 8000 U/min). Zwischenzeitlich wurde der Lysepuffer angesetzt (s. Kapitel 2.1.4), der Überstand nach der Zentrifugation vollständig abgenommen und 80 μ l des Puffers hinzugegeben, gemischt und gevortext. Inkubationszeit von 10min bei RT und anschließend zentrifugiert (10min, 4°C, 13000 U/min). Es wurden pro Reaktionsgefäß zwei weitere 0,5ml Eppis vorbereitet, die einerseits für die Proteinquantifikation und andererseits für den Western Blot genutzt wurden. Nach dem Zentrifugieren wurde 52 μ l des Überstands in die Western Blot Eppis überführt, die

mit 8µl 10x NuPage Sample Reducing Agent (NP0004) und 20µl 4x NuPage LDS Buffer (NP0007) vorbereitet waren. Der restliche Überstand galt der Proteingehaltsbestimmung.

2.2.7.3 Proteinquantifikation

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein BCA Assay durchgeführt. Die Standardproben und der BCA-Puffer wurden gemäß des Herstellerprotokolls vorbereitet. Die Proben mit den isolierten Proteinen wurden mit PBS 1:3 verdünnt, bevor diese wie die Standardproben auf einer ELISA Platte als Duplikate pipettiert wurden (je 10µl). Es wurde in jedes *well* 200µl des BCA-Puffers hinzugegeben, die Platte versiegelt und für 30min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Platten wurden mittels Platten-*Readers* bei 580nm gemessen und die Standardkurve erstellt.

2.2.7.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) in einer Novex-Mini-Cell. Um die Proteinstruktur aufzulösen, wurden diese für 10min bei 70°C denaturiert und anschließend zentrifugiert (5min, 4°C, 10000 U/min). Die Zellkammer wurde mit MOPS SDS *Running Buffer* aufgefüllt. Die Proteine (25µg) konnten folglich in die Taschen eines Polyacrylamidgels (4-12%) geladen werden, als Molekulargewichtsstandard wurde links und rechts der Proben 10µl von *Precision Plus Protein All blue prestained Protein Standards* oder *Precision Plus Protein Dual Color Standards* aufgetragen. 500µl Antioxidant wurde hinzugefügt und das Gel samt Proben für ca. 2h bei 100 Volt unter Spannung gesetzt.

2.2.7.5 Blotten

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran erfolgte in 1x NuPage *Transfer Buffer* im *Tank transfer system* zwei Stunden unter Kühlbedingungen bei einem konstanten Strom von 200 mA. Die PVDF-Membran musste vor dem *Blotten* für 10min in Methanol aktiviert werden.

2.2.7.6 Immunodetektion

Nach dem Western Blot musste die Membran in *Blocking Buffer* inkubiert werden (1h, RT, Schüttler), um unspezifisches Antikörperbinden zu unterdrücken. Über Nacht wurde der primäre Antikörper für das gesuchte Protein hinzugegeben (16h, 4°C, Schüttler). Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit 1x TBS *Washing Buffer* (15min, RT, Schüttler) gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in *Blocking Buffer* inkubiert (1h, RT, Schüttler). Nach erneutem Waschen (3x15min, RT, Schüttler) konnten die Banden mittels *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* und dem *ChemiDoc Touch Imager* anhand von Chemilumineszenzmessung detektiert werden.

2.2.7.7 Stripping

Stripping ist der Vorgang, bei dem der zuvor aufgetragene Primär- und Sekundärantikörper entfernt wird, um einen neuen Antikörper auftragen zu können und ein weiteres gesuchtes Protein detektieren zu können. Dafür wurde nach der Immunodetektion *Re-blot Plus Strong Solution* hinzugegeben (15min, RT, Schüttler), kurz mit 1x TBS *Washing Buffer* ausgespült, anschließend eine Stunde bei RT geblockt und der neue Antikörper über Nacht aufgetragen (16h, 4°C, Schüttler).

2.2.8 Statistik/Datenanalyse

FACS-Daten wurden mit der *Software* FlowJo verarbeitet. Weitere Datenverarbeitung erfolgte mittels Microsoft Excel und GraphPad Prism. Die statistischen Analysen (*wilcoxon paired signed-rank test*) wurden mit GraphPad Prism durchgeführt. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung stimulierter Monozyten

Für die Phänotypisierung frisch isolierter Monozyten wurden Monozyten mit LPS (1ng/ml), Pam3 (100ng/ml) oder GM CSF (5ng/ml) stimuliert und verschiedene Oberflächenmarker durchflusszytometrisch gemessen. Hierzu wurde die (Ko-)Expression der IL-7R α - und TSLPR-Ketten und des Oberflächenmarkers CD11b (Tabelle 9) berücksichtigt.

Zunächst wurde die Expression der jeweiligen Rezeptorketten auf Einzelzellebene bestimmt. Abb. 2 veranschaulicht die Proportionen der TSLPR+ bzw. IL-7R α + Monozyten nach 24h Stimulation. Hierbei wird deutlich, dass die IL-7R α -Expression stimulierter Monozyten mit ca. 35-70% im Gegensatz zu TSLPR (ca. 1,5-6%) um mehr als das Zehnfache höher liegt. Für LPS ist die Expression der TSLPR- und IL-7R α -Kette am höchsten. Unstimulierte Monozyten zeigen etwas mehr TSLPR-Expression als IL-7R α .

Expression von TSLPR und IL-7Ra bei stimulierten Monozyten

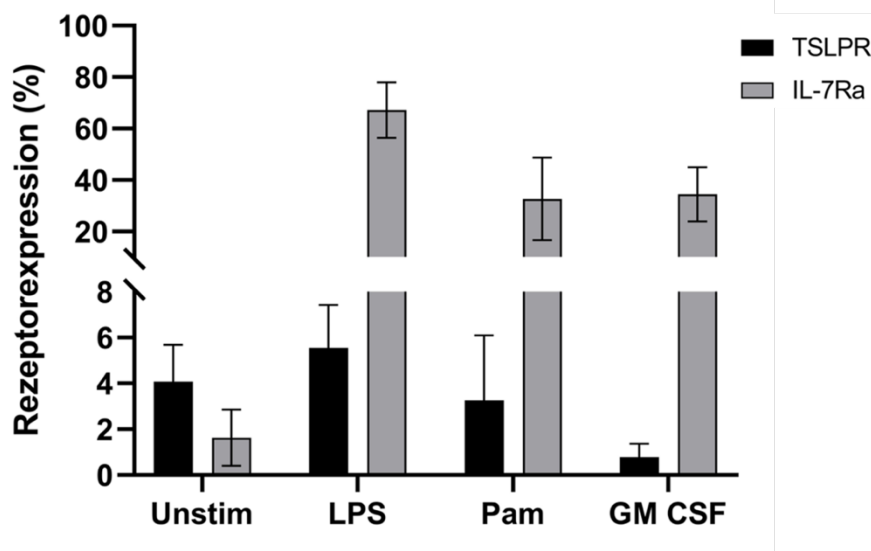


Abb. 2: *Moderate Hochregulation des TSLP-Rezeptors auf in vitro stimulierten Monozyten.* n=4. Durchflusszytometrische Messungen der TSLPR- und IL-7R α -Kettenexpression (separat) bei primären Monozyten nach 24h Inkubation unstimuliert vs. Stimulation mit LPS (1ng/ml), Pam (100ng/ml), GM CSF (5ng/ml).

Als nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Hochregulierung der beiden Rezeptorketten auf derselben Monozytenoberfläche koexprimiert werden und sich dadurch die Bildung des TSLPR Heterokomplexes (TSLPR/IL-7R α) ermöglicht wird. Abb. 3 zeigt die *Gating*strategie der FACS-Plots nach der durchflusszytometrischen Messung über FlowJo. Zunächst werden im FSC-H (*Forward-Scatter Height*) / FSC-A (*Forward-Scatter Area*) alle Zelldoubletten und Zelltrümmer bzw. Detritus exkludiert. Im FSC-A/SSC-A (*Side-Scatter Area*) ist die Größe und Densität der Zellen abgebildet; hier wird nach der Monozytenpopulation *gated*. Um eine möglichst hohe Reinheit an Monozyten zu erhalten und die toten Zellen auszuschließen, werden mit *Viability*-Färbung und CD11b als Monozytenmarker die lebendigen, CD11b+ Zellen eingegrenzt.

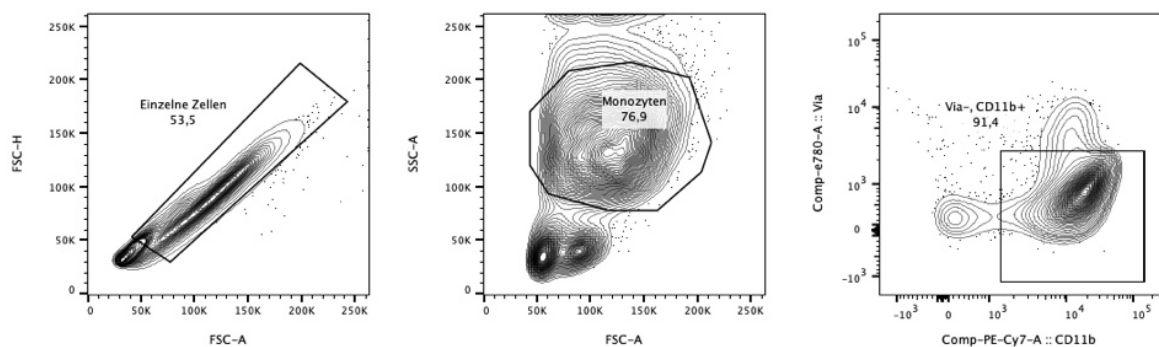


Abb. 3: **Gatingstrategie Monozyten.**

Von links nach rechts: *Gating* einzelner Zellen (*singlets*), Monozyten nach Größe und Densität aussortiert, *Viability* negative und CD11b positive Monozyten.

Um das *Gating* für die (wahre) Rezeptorexpression (Abb. 4) zu justieren und möglichst wenig Hintergrundsignal miteinfließen zu lassen, wurde die Isotypenkontrolle (IC) der beiden Rezeptorantikörperfarben genutzt (APC IC für TSLPR und PE IC für IL-7R α). Aufgefallen ist der im Gegensatz zum PE IC hohe Hintergrund bei APC IC. Die Isotypenkontrolle von PE wurde bei den unstimulierten Zellen verwendet und auf alle anderen Proben angewendet. Da sich die Messungen bei APC IC zwischen unstimulierten und stimulierten Monozyten deutlich unterschied, wurde die Isotypenkontrolle jeweils bei beiden Konditionen verwendet und entsprechend übertragen.

In dieser Arbeit ist vor allem die Koexpression der beiden Rezeptoren TSLPR und IL-7R α von Bedeutung. Daher wurde TSLPR auf der x-Achse und IL-7R α auf der y-Achse geplottet, somit zeigt der rechte obere Quadrant die koexprimierenden Zellen an.

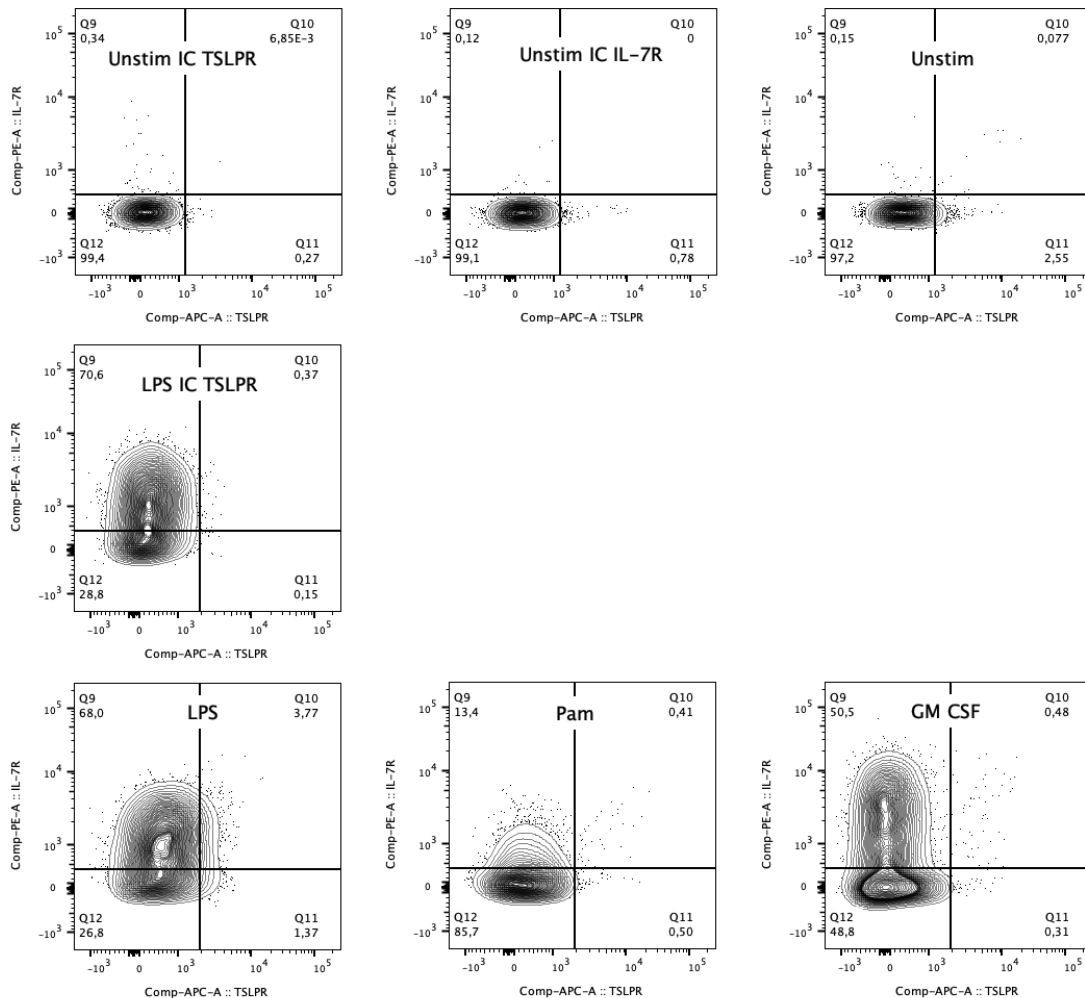


Abb. 4: **Gatingstrategie für Rezeptorexpression.**

Unstim IC IL-7R α wurde für das Gating auf alle Plots angewandt. *IC TSLPR* Gating wurde von LPS stimulierten Zellen auf Pam3 und GM CSF stimulierte Monozyten transferiert. LPS= Lipopolysaccharid, Pam=Pam3, GM CSF= Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor, unstim= unstimuliert, IC=Isotypenkontrolle.

Abb. 5 zeigt die Proportionen der doppelt positiven, d.h. IL-7R α und TSLPR exprimierende Monozyten jeweils unstimuliert und nach Induktion der Expression durch Stimulation. Alle drei Stimulationen zeigen einen signifikanten Anstieg von koexprimierenden Monozyten. Am stärksten ist dieser Effekt bei LPS (ca. 1-4%, p=0,0156)

zu beobachten. Pam3 und GM CSF induzieren die Koexpression beider Rezeptorketten etwas schwächer (ca. 0,1-0,8% TSLPR+IL-7Ra+ Monozyten, Pam $p=0,0312$; GM CSF $p=0.0469$).

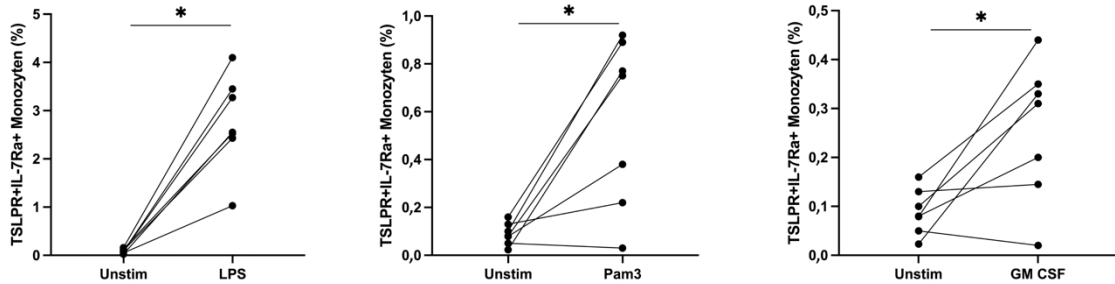


Abb. 5: **TSLP-Rezeptor positive Monozyten exprimieren IL-7R α .**

$n=7$. Von links nach rechts: Anteil doppelt positiver Monozyten unstimuliert vs. stimuliert mit LPS ($p=0.0156$), Pam3 ($p=0.0312$) und GM CSF ($p=0.0469$).

Die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (geometric Mean Fluorescent Intensity, gMFI) ist ein relatives Maß für die Menge eines Fluoreszenzfarbstoffs pro Partikel, der in der Durchflusszytometrie verwendet wird. Zur weiteren Phänotypisierung der primären Monozyten nach Stimulation wurde die Fluoreszenzintensität des Oberflächenmarkers CD11b beurteilt (Abb. 6). Es zeigte sich eine moderate stimulationsinduzierte Hochregulation.

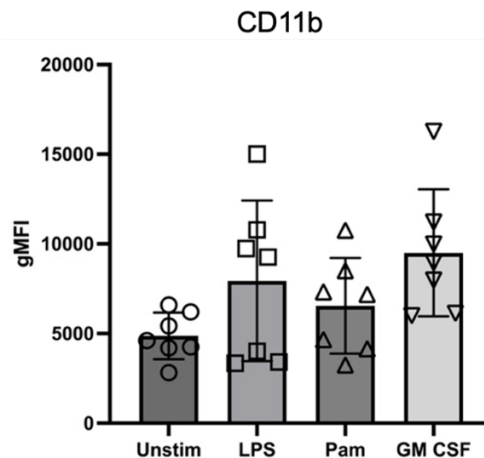


Abb. 6: **Stimulationsinduzierte Expression von CD11b auf Monozyten.**

$n=7$. Durchflusszytometrische Messungen der geometrischen mittleren Fluoreszenzintensität von CD11b nach 24h unstimuliert vs. Stimulation mit LPS (1ng/ml), Pam (100ng/ml) oder GM CSF(5ng/ml). gMFI= geometrische mittlere Fluoreszenzintensität

3.2 Induzierte STAT5 Phosphorylierung und Verhältnis von pSTAT5 zur TSLPR/IL-7R α Expression in primären Monozyten

3.2.1 Induktion von pSTAT5 durch TSLP und IL-7

Für die Charakterisierung der Signaltransduktion nach TSLP bzw. IL-7 Zugabe wurden vier Experimente durchgeführt. Der Fokus lag hierbei auf der Messung des phosphorylierten STAT5 Proteins, das als Zeichen einer erfolgreichen Stimulation des Rezeptors mit dem Zytokin gewertet wurde.

Dazu wurden Monozyten aus PBMCs isoliert und über Nacht mit und ohne LPS inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit TSLP oder IL-7 stimuliert (Abb. 7).

Um gleichzeitig zu untersuchen, wie hoch der Anteil der pSTAT5-positiven Zellen von der Gesamtheit der koexprimierenden Monozyten bzw. IL-7R α exprimierenden Monozyten beträgt, wurde jeweils eine zweite 96 *wells* Platte für die Messung der Rezeptorexpression vorbereitet (gleiches Verfahren wie in Kapitel 3.1, bzw. für Methoden siehe Kapitel 2.2.5 und 2.2.6). Anders als bei den Experimenten in Kapitel 3.1 wurde hier der Monozytenmarker HLA-DR anstatt CD11b gefärbt und zum *Gating* verwendet (Tabelle 10).

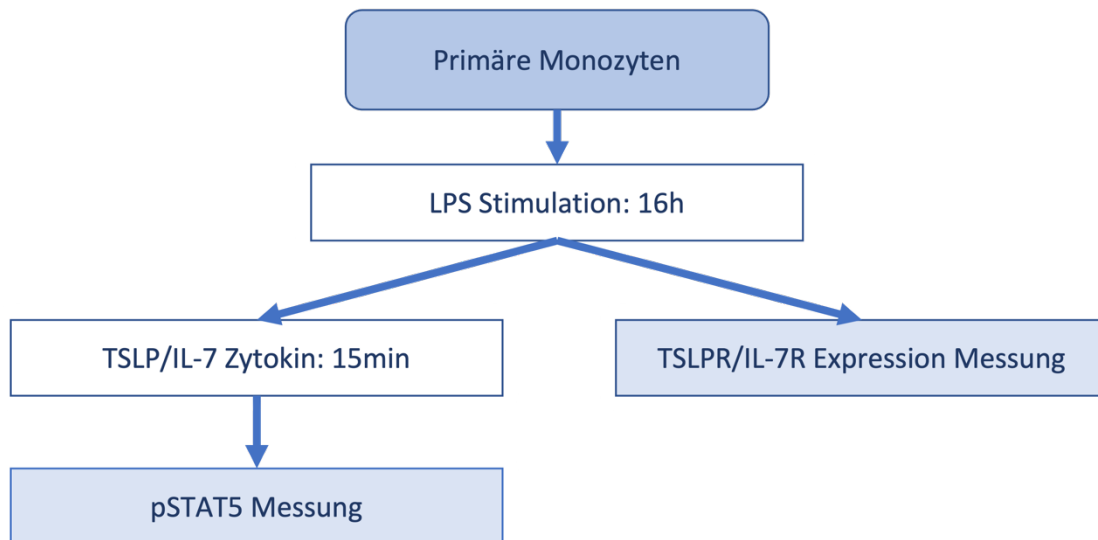


Abb. 7: **pSTAT5 Experiment mit gleichzeitiger Messung der Rezeptorexpression.**

Design des pSTAT5 Experiments. LPS-Stimulation mit 1ng/ml, Zytokinstimulation mit TSLP (0,1ng/ml, 1ng/ml und 10ng/ml) oder IL-7 (1ng/ml).

Für frisch isolierte primäre Monozyten eignete sich eine Messung mittels Durchflusszytometrie, da anders als beim Western Blot die unvermeidbare Kontamination mit bspw. T-Zellen durch die Möglichkeit des *Gating*s via FlowJo teils umgangen werden kann.

In Abb. 8 wird ein *Gating*beispiel aufgeführt. Im FSH-H/FSC-A *plot* wurden die *singlets* eingeschlossen, mittels SSC-A/FSC-A konnte die Monozytenpopulation ausfindig gemacht und dann die HLA-DR positiven Monozyten eingegrenzt werden. Beim pSTAT5 Experiment war eine *Viability*-Färbung nicht sinnvoll, da die Zellmembran durch die Behandlung mit Methanol zerstört wird, um die intrazellulären STAT5 Proteine anfärben zu können. Daraus würde folgen, dass alle Zellen *Via+* wären. Für das *Gating* der pSTAT5 positiven Zellen wurden unstimulierte, nicht mit Zytokin behandelte Proben als Referenz genommen. Zusätzlich wurde versucht, sich auf die HLA-DR hoch positiven Monozyten zu fokussieren, da diese auch bei der Messung der Rezeptorexpression am ehesten den TSLPR Komplex (TSLPR+IL-7R α +) exprimierten.

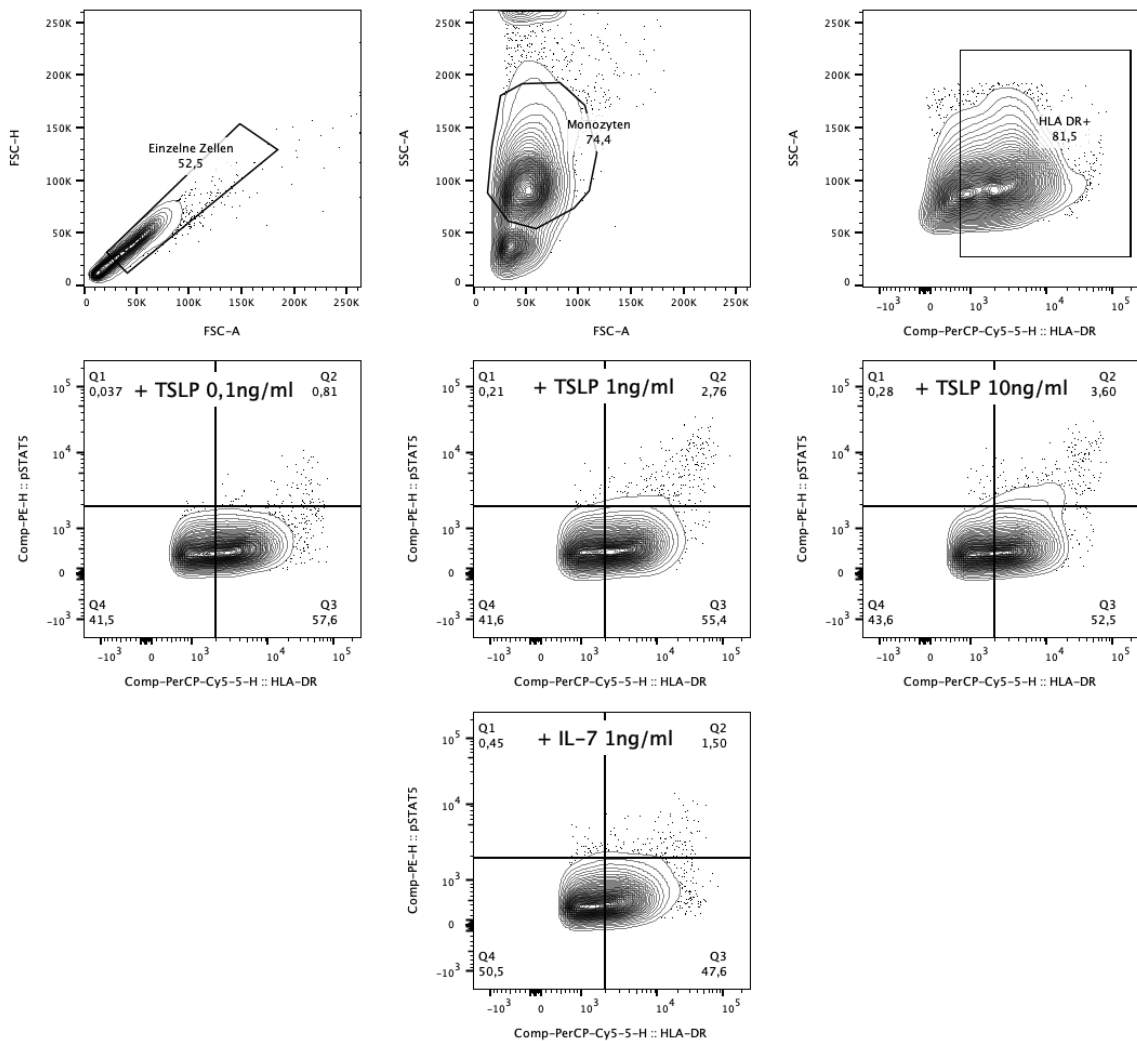


Abb. 8: Gatingstrategie für pSTAT5 Messung an LPS aktivierten primären Monozyten.

Monozyten wurden vorher 6h mit LPS aktiviert, anschließend mit TSLP oder IL-7 für 15 min behandelt. Obere Reihe von links nach rechts: Zeldetritus und Dubletten wurden ausgeschlossen, Monozyten im FSC-A/SSC-A gated, HLA DR positive Monozyten eingeschlossen. Mittlere Reihe: LPS aktivierte Monozyten +0,1ng/ml TSLP, 1ng/ml TSLP, 10ng/ml TSLP. Unterer Plot: LPS aktivierte Monozyten +1ng/ml IL-7.

Das Experiment wurde viermal durchgeführt und die Ergebnisse in Abb. 9 zusammengetragen, in der ein möglicher Titrationseffekt bei LPS aktivierten Monozyten zu erkennen ist: ohne TSLP 0,265% pSTAT5, bei 0,1ng/ml TSLP 1,06% der Zellen, 1ng/ml TSLP zeigt 2,78% pSTAT5 positive Monozyten und 10ng/ml führt durchschnittlich zu 3,85% pSTAT5 Induktion.

Die Ergebnisse der parallelen Messung der Rezeptorexpression ist in Abb. 10 zu finden. Durchschnittlich 0,89% der unstimulierten Zellen exprimieren dabei den TSLPR Komplex, mit LPS-Stimulation sind es ca. 2%.

Zum Vergleich wurden Monozyten mit IL-7 stimuliert, welches neben der IL-7R α Kette an die *common gamma* Kette (γ c) bindet und ebenfalls eine Phosphorylierung des *Signal Transducers and Activators of Transcription* 5 (STAT5) auslöst, jedoch über JAK1 und JAK3 (Mazzucchelli & Durum, 2007). Durchschnittlich lag die IL-7 induzierte pSTAT5 positive Population bei ca. 2,1% (Abb. 9).

Die IL-7R α Expression bei ruhenden Monozyten ist eher gering, ca. 0.98%, nach PAMP-Stimulation deutlich hochreguliert, ca. 50% (Abb. 10).

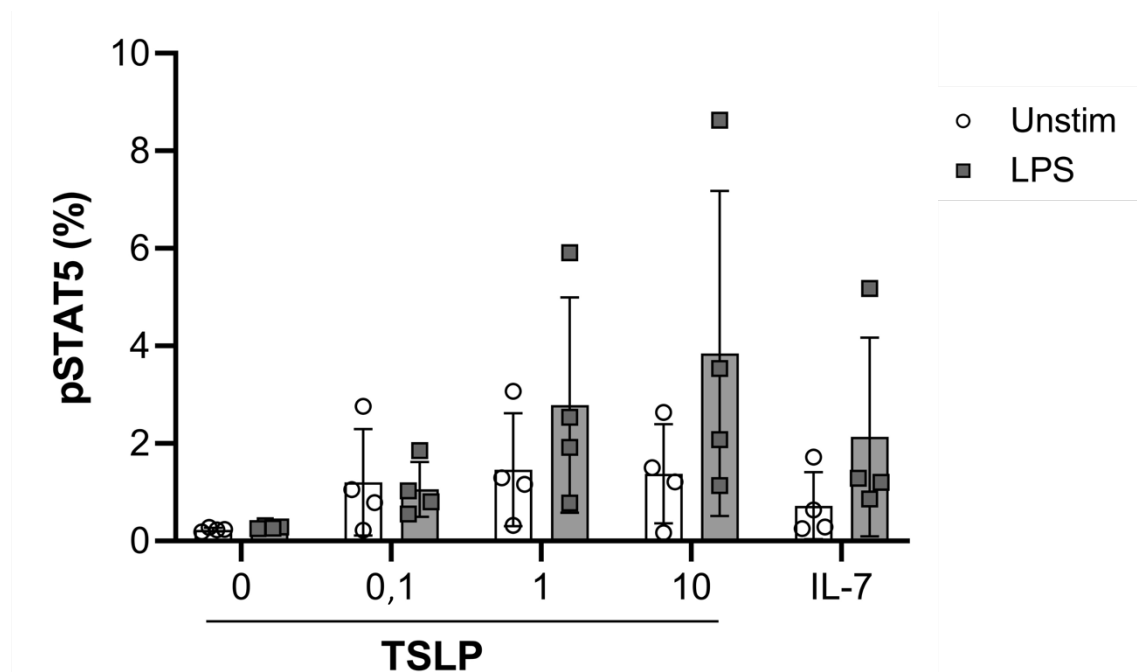


Abb. 9: TSLP-induzierte STAT5 Phosphorylierungsrate in LPS-stimulierten Monozyten im Vergleich zu IL-7.

n=4. Inaktivierte und mit LPS aktivierte Monozyten wurden mit 0,1ng/ml, 1ng/ml oder 10ng/ml TSLP oder 1ng/ml IL-7 stimuliert und durchflusszytometrisch die Proportion pSTAT5 positiver Monozyten gemessen (pSTAT5 = phosphoryliertes STAT5).

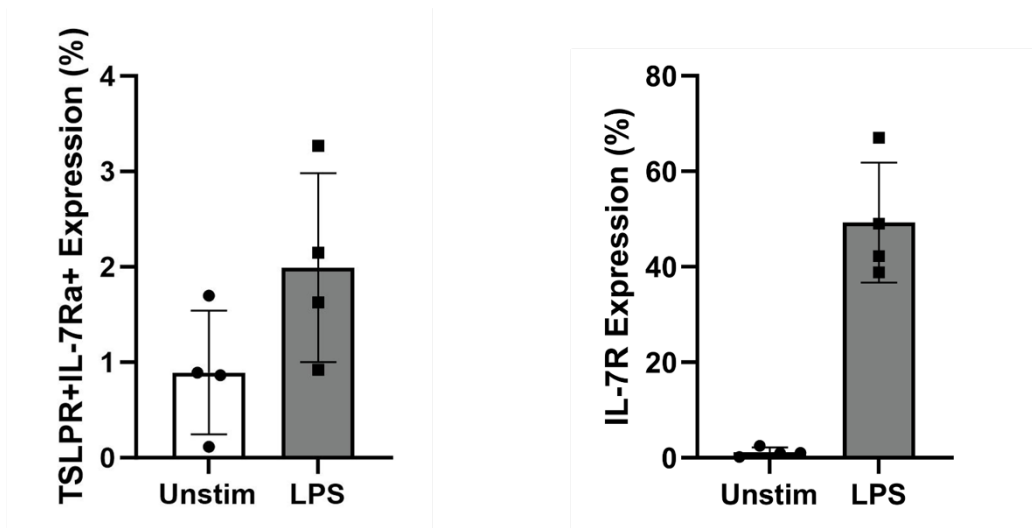


Abb. 10: **Hochregulation der Rezeptorexpression nach in vitro Stimulation.**

n=4. Durchflusszytometrische Messungen der TSLPR-Komplex (links) und IL-7R (rechts) Expression bei primären Monozyten nach 16 h Inkubation mit und ohne LPS (1ng/ml).

3.2.2 Verhältnis pSTAT5 Induktion von IL-7R und TSLPR-Komplex Rezeptorexpression

Im nächsten Schritt berechneten wir eine Relation pSTAT5-positiver Monozyten von der Gesamtpopulation TSLPR-Komplex bzw. IL-7R positiver Monozyten nach TSLP bzw. IL-7 Gabe.

Diese Relation wurde für die Kondition „unstimuliert“ und „LPS stimuliert“ und für jede Konzentration des Zytokins separat wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Anteil pSTAT5 positiver Monozyten}}{\text{Rezeptorexpression}} \times 100$$

Um sicherzustellen, dass die Monozyten, die positives pSTAT5 aufweisen, auch zu denen gehören, die den entsprechenden Rezeptor exprimieren, wurden die Zellen aus einem Pool parallel auf zwei 96 wells Platten aufgeteilt (eine für die Messung der Rezeptorexpression, die andere Platte für das pSTAT5 Experiment) und gleichzeitig behandelt. Außerdem wurden in beiden Experimenten nach HLA-DR als

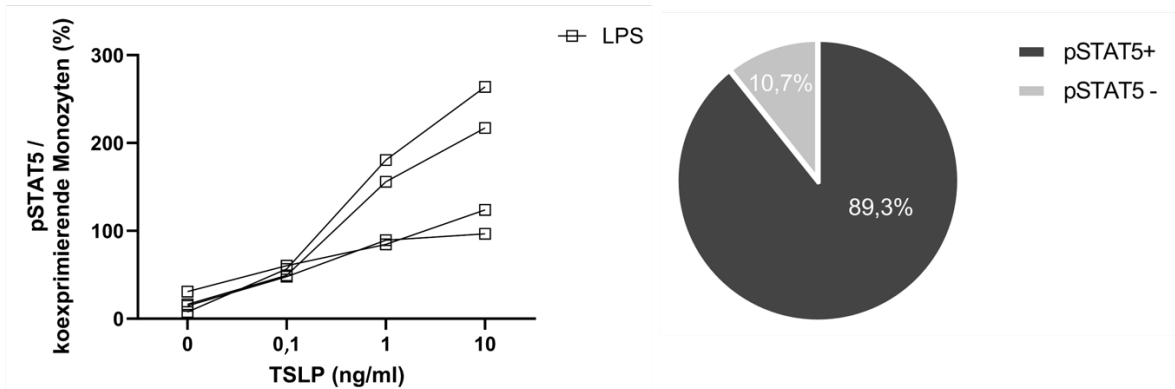
Monozytenmarker gated, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen und die Plausibilität der Berechnung zu erhöhen.

Abb. 11 zeigt die Ergebnisse dieser Relation bei LPS stimulierten Zellen nach TSLP-Gabe. Durchschnittlich zeigen sich bei den vier Experimenten ohne TSLP 17,3% der TSLPR Komplex exprimierenden Zellen als pSTAT5 positiv. Nach 0,1ng/ml TSLP sind es bereits ca. die Hälfte der TSLPR+IL-7R α + Monozyten, mit 53,5%. 1ng/ml TSLP zeigt pSTAT5 bei 127,6% der koexprimierenden Monozyten und 10ng/ml TSLP 175,3%. Dass sich Ergebnisse über 100% errechnen lassen, liegt daran, dass ein höherer Prozentsatz an pSTAT5 im Gegensatz zur Rezeptorexpression gemessen wurde.

Gleiches wurde für die IL-7R α Expression und pSTAT5 nach IL-7 (1ng/ml) Gabe berechnet und veranschaulicht (Abb. 11). Der relative Anteil pSTAT5 positiver Monozyten von der gesamten IL-7R α exprimierenden Population beträgt durchschnittlich nur ca. 3,8%.

A

Relativer Anteil pSTAT5 positiver TSLPR+IL-7Ra+ Monozyten nach TSLP Gabe



B

Relativer Anteil pSTAT5 positiver IL-7R+ Monozyten nach IL-7 Gabe

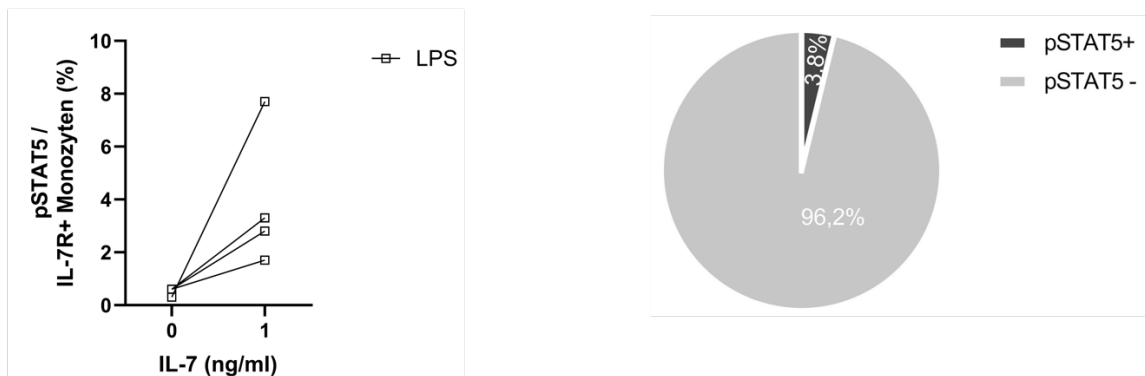


Abb. 11: TSLP (A) vs. IL-7 (B) induzierte STAT5 Phosphorylierungsrate in LPS-stimulierten Monozyten.

A+B: links: n=4, berechnet aus durchflusszytometrischen Messungen der Rezeptorexpression und pSTAT5 positiver Monozyten. Kreisdiagramm rechts: pSTAT5 Proportion/Rezeptorexpression repräsentativ für 1ng/ml TSLP/IL-7 (pSTAT5 = phosphoryliertes STAT5).

3.3 MonoMac 1 / MonoMac 6: Induzierte TSLPR/IL-7R α Expression und TSLP/IL-7 induzierte STAT5 Phosphorylierung

Aufgrund der Reinheit monozytärer Zelllinien ist eine Proteinbestimmung der Signaltransduktion mittels Western Blot-Analyse (Immunodetektion) möglich. Ziel ist es, die Funktionalität des Rezeptors anhand der Phosphorylierung der

Januskinasen und des STAT5 Proteins zu überprüfen. PBMCs dienen hierbei als Positivkontrolle. Wie bei den primären Monozyten wurden sowohl TSLP als auch IL-7 als Zytokine eingesetzt.

3.3.1 Rezeptorexpression

Auch bei MonoMac 1 und 6 konnte eine stimulationsinduzierte Expression der TSLPR Kette neben der IL-7R α Kette gemessen werden (Abb. 12). Dabei reagierten MonoMac 6 Zellen empfindlicher auf die Stimulation als MonoMac 1. MonoMac 6 zeigten nach 24h Inkubation ohne Stimulation 0,75% koexprimierende Monozyten, nach LPS Gabe 1,67% und Pam3 induzierte bei 1,28% der Zellen eine TSLPR/IL-7R α Rezeptorkoexpression. MonoMac 1 hingegen zeigten unstimuliert 0,37%, mit LPS Stimulation 0,62% und mit Pam3 0,7% Koexpression.

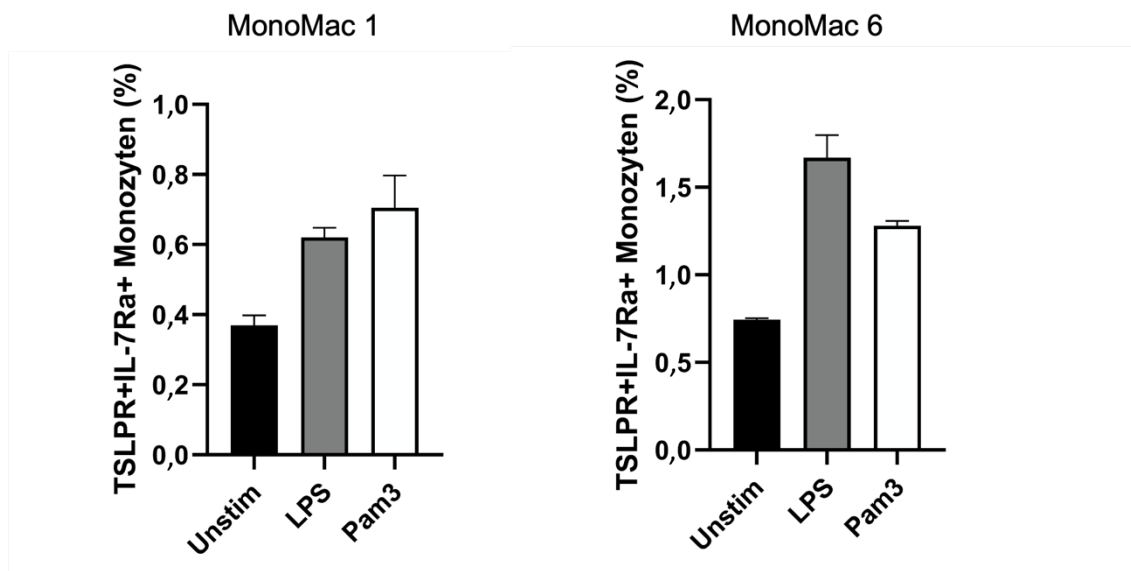


Abb. 12: MonoMac 1 und MonoMac 6 exprimieren TSLPR und IL-7R α Kette nach in vitro Stimulation.

Durchflusszytometrische Messungen der Rezeptorexpression nach 24h Inkubation unstimuliert vs. Stimuliert (LPS 1ng/ml, Pam3 100ng/ml) bei MonoMac 1 und MonoMac 6.

3.3.2 Induktion von pSTAT5 durch TSLP und IL-7

MonoMac 1 und 6 Zellen wurden vor der Stimulation mit TSLP und IL-7 mit LPS inkubiert, um die Rezeptorexpression des IL-7R (Adankwah et al., 2021; Al-Mossawi et al., 2019) und möglicherweise die des TSLPR hochzuregulieren.

In Abb. 13 zu sehen sind die detektierten Proteinbanden nach der jeweiligen Zytokinstimulation. Für MonoMac 6 ist bereits ohne Gabe eines Zytokins eine STAT5 Phosphorylierung zu erkennen. Für MonoMac 1 sind die Banden für pSTAT5 ähnlich in deutlich abgeschwächter Form zu sehen. STAT5 konnte für alle Proben detektiert werden.

Die Detektion der phosphorylierten JAK-Proteine stellte sich schwierig dar, lediglich JAK3 konnte für MonoMac 6 deutlich gezeigt werden. MonoMac 1 zeigt schwache JAK3 Banden. Weder JAK2 noch pJAK2 wurden detektiert (Daten nicht gezeigt).

Das β -actin zeigt insgesamt eine etwas höhere Proteinmenge der MonoMac 1 als die geladenen Proteine von MonoMac 6.

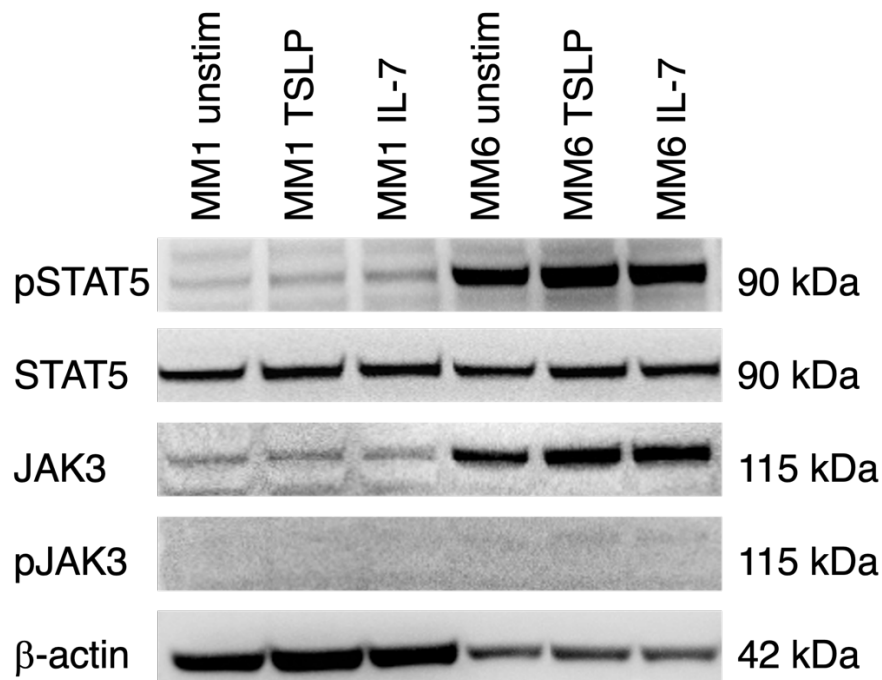


Abb. 13: **Western Blot LPS aktivierter MonoMac Zellen stimuliert mit TSLP und IL-7.**

Zellen wurden zuvor 6h mit LPS (1ng/ml) aktiviert. Detektion der Proteine pSTAT5, STAT5, JAK3 und pJAK3. TSLP und IL-7 Stimulation mit jeweils 10ng/ml. Rechts: Größe der gesuchten Proteinbande in Kilodalton. MM1=MonoMac 1, MM6=MonoMac 6.

3.4 THP-1 Zellen: Induzierte TSLPR/IL-7R α Expression und TSLP/IL-7 induzierte STAT5 Phosphorylierung

Für die folgenden Experimente wurde die THP-1 Zelllinie in zwei Formen verwendet: Zum einen als von unserer Arbeitsgruppe transduzierte THP-1 Zelllinie, die IL-7R α überexprimiert (IL-7R α positive THP-1-Zellen oder „cDNA-Zellen“), zum anderen als zugehörige Vektorkontrolle („VC“) ohne Rezeptorüberexpression.

3.4.1 Rezeptorexpression

Wie in Abb. 14 ersichtlich, wurde vergleichbar zu den primären Monozyten *gated*, mit dem Unterschied, dass der Marker für das GFP eine entscheidende Rolle spielt, um die Monozyten der Vektorkontrolle mit denen der IL-7R α überexprimierenden Zellen vergleichen zu können. Der obere rechte Quadrant zeigt die Koexpression der Rezeptoren an (TSLPR+IL-7R α + Monozyten).

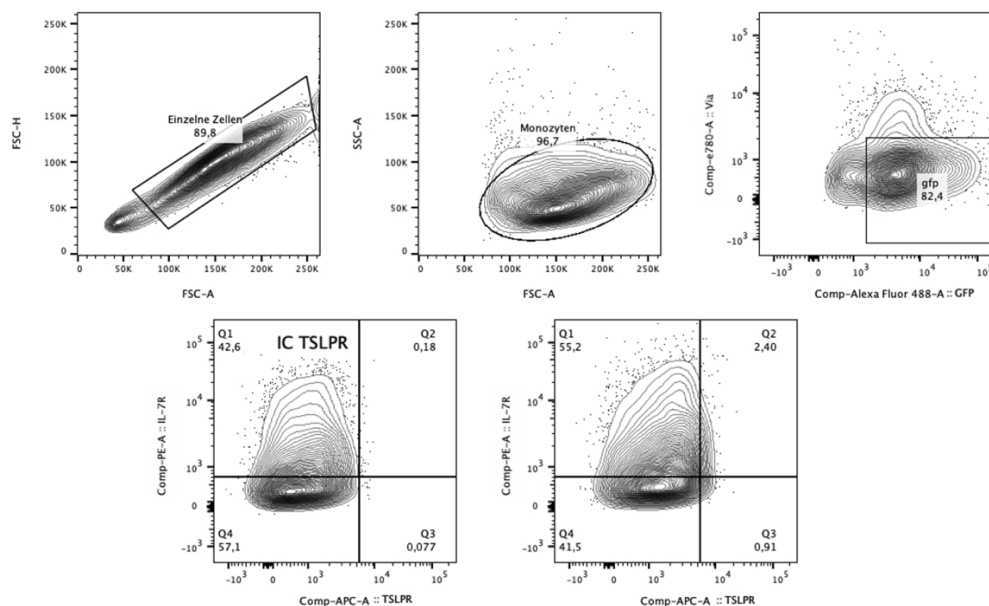


Abb. 14: **Gatingbeispiel unstimulierter THP-1 IL-7R α + Zellen.**

Obere Reihe von links nach rechts: Gating einzelner Zellen (singlets), Monozyten nach Größe und Densität aussortiert, Viability negative und GFP positive THP-1 Zellen gated. Untere Reihe: Gating wurde anhand IC IL-7R α (hier nicht gezeigt) und IC TSLPR (links) festgelegt.

Nach 24 h Inkubation zeigen unstimulierte Vektorkontrolle-Zellen eine kaum messbare Population von doppelt positiven Zellen von 0,03%, mit LPS-Stimulation sind es 0,1%. Die cDNA-Zellen koexprimieren ohne Stimulation zu 2,06% beide gesuchten Rezeptoren, während die doppelt positiven Zellen nach LPS-Zugabe bei 0,57% liegen (Abb. 15).

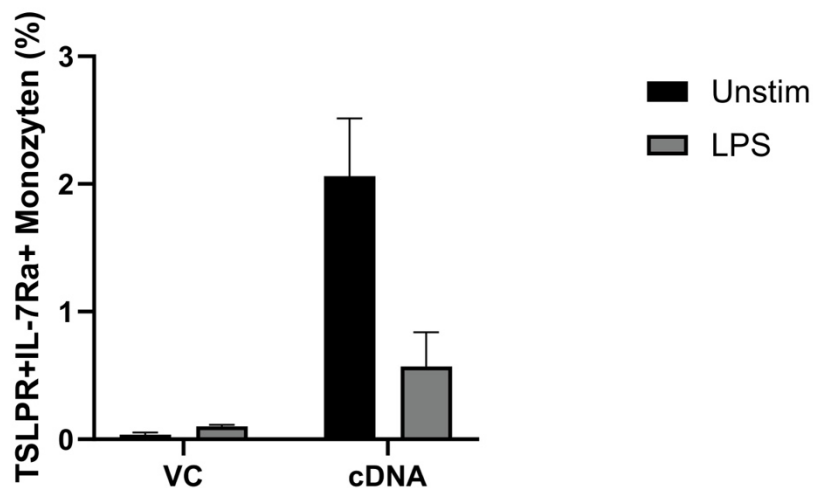


Abb. 15: *Transduzierte IL-7Rα überexprimierende THP-1 Zellen koexprimieren die TSLPR Kette.*

Durchflusszytometrische Messungen bei VC und cDNA-Zellen mit und ohne LPS-Stimulation (1ng/ml). (VC=Vektorkontrolle, cDNA= IL-7Rα überexprimierende transduzierte THP-1 Zellen)

3.4.2 Induktion von pSTAT5 durch TSLP und IL-7

Für die Messung der Phosphorylierungsrate wurde wie bei MonoMac 1 und 6 das Western Blot-Verfahren angewendet. THP-1 Zellen wurden ohne PAMP-Stimulation in den Platten vorbereitet und neben der unbehandelten Platte jeweils mit 10ng/ml TSLP und mit 10ng IL-7 behandelt. Abb. 16 zeigt die Ergebnisse der Immunodetektion der gesuchten Proteine und dem β-actin, das als Ladekontrolle diente.

PBMCs zeigen eine deutliche pSTAT5 Bande nach IL-7 Stimulation, so wie es bereits von Belarif et al. beschrieben wurde, und sind somit als Positivkontrolle geeignet (Belarif et al., 2018). Bei der Vektorkontrolle konnte weder nach TSLP noch IL-7 Gabe pSTAT5 gemessen werden. Interessanterweise zeigt sich bei den transduzierten IL-7Rα überexprimierenden THP-1 Zellen (in der Abbildung als „cDNA“

bezeichnet) eine Bande nach TSLP-Stimulation, nicht jedoch nach IL-7 Gabe. STAT5 Protein konnte in allen Proben detektiert werden.

Es wurden auch die Januskinasen 2 und 3 gefärbt, JAK 2 ist spezifisch für TSLPR, JAK3 für die common- γ -Kette des IL-7 Rezeptors. Die Banden des (p)JAK 2 konnten nicht detektiert werden und sind nicht gezeigt. Die unphosphorylierten JAK3 Proteine hingegen konnten nur bei PBMCs gezeigt werden, pJAK3 zeigt sehr schwache Banden, etwas stärker nach TSLP/IL-7 Gabe zu erahnen. Weder bei der Vektorkontrolle noch bei den cDNA-Zellen kann (p)JAK3 nachgewiesen werden.

β -actin als Ladekontrolle zeigt eine etwa gleichmäßige Verteilung an Proteinmenge der Proben.

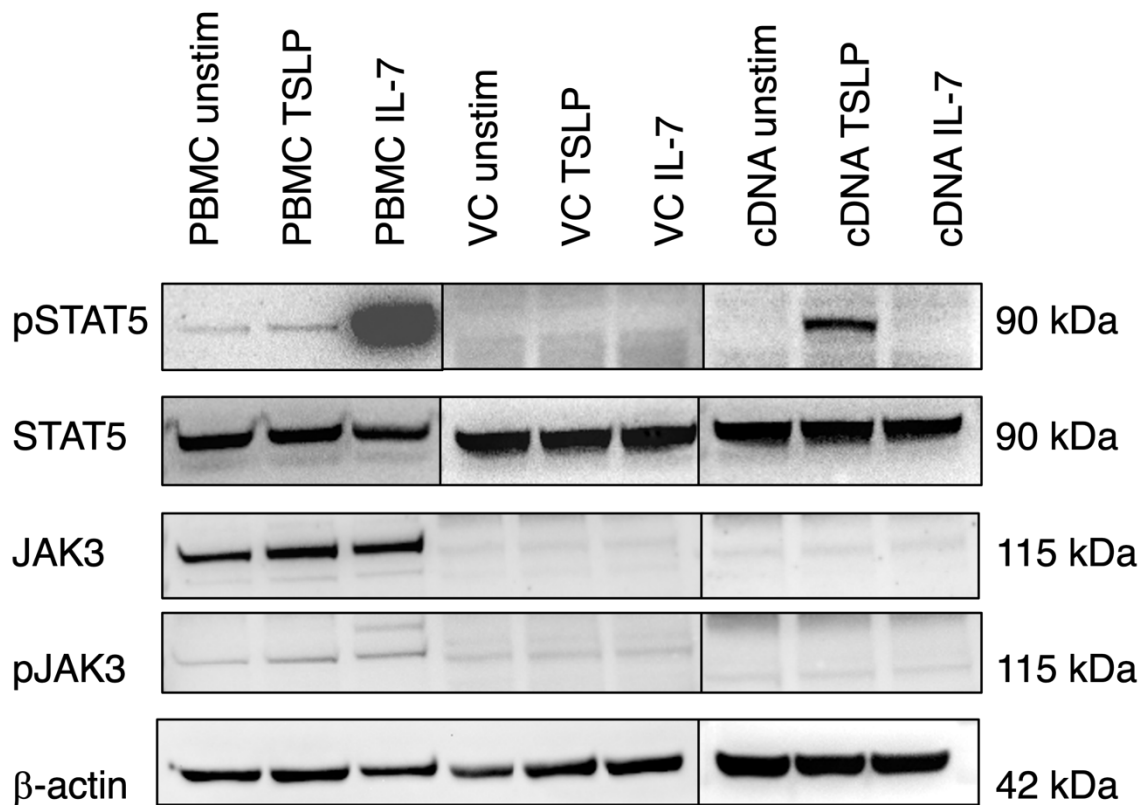


Abb. 16: IL-7R α transduzierte THP-Zellen sind sensitiv für TSLP aber nicht für IL-7.

Detektion der Proteine pSTAT5, STAT5, JAK3 und pJAK3. PBMCs dienen als Positivkontrolle. TSLP und IL-7 Stimulation mit jeweils 10ng/ml. Rechts: Größe der gesuchten Proteinbande in Kilodalton. VC=Vektorkontrolle, cDNA= IL-7R α transduzierte THP-1 Zellen, PBMC= periphere mononukleäre Blutzellen, unstim= unstimuliert.

4 Diskussion

Der Fokus der Arbeit lag darin, die TSLP-Rezeptorexpression auf Monozyten und Monozyten-Zelllinien zu charakterisieren und die TSLPR/IL-7 induzierte Signaltransduktion zu entschlüsseln.

4.1 Die simultane Hochregulation der TSLPR- und IL-7R α -Kette nach Stimulation ist zentral für die TSLP-Antwort in einer kleinen Subpopulation von Monozyten

Stimulationsinduzierte Koexpression der IL-7R α - und TSLPR Kette

Grundsatz der Forschung dieser Arbeit am TSLPR war die von Al-Mossawi et al., 2019 beschriebene Hochregulierung des IL-7R α durch Stimulation, die hier reproduziert werden konnte (Abb. 2).

Daneben induzieren proinflammatorische und infektiöse Stimuli auch die Expression des TSLPR-Komplexes (Lee et al., 2012; Miazgowicz et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei primären Monozyten gezeigt werden, dass nach Stimulation mit GM-CSF und proinflammatorischen PAMPs wie LPS und Pam3 eine Koexpression des TSLPR neben der IL-7R α Kette vorliegt (Abb. 5). Besonders LPS schien als potentester Stimulator eine Koexpression in Monozyten hervorzurufen und wurde daher später auch für die pSTAT5 Messungen verwendet. Diese Beobachtungen spiegeln die Ergebnisse von Borriello et al. wider (Borriello et al., 2017). Im Gegensatz zum Anteil des IL-7R α auf der Monozytenoberfläche mit ca. 50% ist die Expression des TSLPR und damit der Anteil der TSLPR+IL-7R α + Monozyten mit 1-4% jedoch deutlich geringer.

Weiterhin konnte eine erhöhte HLA-DR Expression von TSLPR+ Monozyten festgestellt werden, wie Borriellos Arbeitsgruppe sie herausarbeitete (Borriello et al., 2017). HLA-DR ist ein MHC-II-Klasse Zelloberflächenrezeptor, der auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird und für eine Aktivierung der Monozyten spricht

(Lambert et al., 2017). Der Großteil pSTAT5-positiver Monozyten lagen im „hoch positiven“ HLA-DR Bereich (HLA-DR $_{high}$) (Abb. 8).

Bei der Analyse der FACS *plots* fiel auf, dass vor allem Monozyten, die reichlich IL-7R α auf der Zelloberfläche exprimierten (IL-7R α_{high}), auch TSLPR exprimierten und somit zu den doppelt positiven Monozyten zählten. Deutlicher ist dies bei Pam3 und GM CSF stimulierten Zellen zu erkennen (Abb. 4). Auch wiederholte sich während der Experimente die Beobachtung, dass die Proportion der Zellen, die den TSLPR exprimierten, ungefähr der TSLPR+IL-7R α + Proportion entsprach. D.h. dass Monozyten, die den TSLP-Rezeptor aufwiesen, größtenteils auch positiv für den IL-7R α Rezeptorarm waren, was andersherum nicht zutraf.

Die in der Arbeit verwendeten Monozyten-Zelllinien konnten die Aussagekraft der Ergebnisse frisch isolierter Monozyten bekräftigen und wurden daher inkludiert. Bei den verwendeten THP-1 Zellen und MonoMac 1 und 6 konnte nach LPS- und Pam-Stimulation eine moderate Hochregulierung der TSLPR+IL-7R α + Monozyten gemessen werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass von einer stimulationsinduzierten Koexpression des TSLP-Rezeptors neben der IL-7R α -Kette ausgegangen werden kann, was die Grundlage für weitere Forschung an der Funktionalität des Rezeptorkomplexes bildet.

TSLP und IL-7 führen zu pSTAT5 Induktion auf Monozyten

Die Phosphorylierung des STAT5 Proteins nach Zytokinstimulation wurde als erfolgreiche Bindung des Liganden und nachfolgende Signaltransduktion des Rezeptors (Reche et al., 2001) gewertet und demnach in dieser Arbeit vorrangig gemessen und analysiert.

Für das TSLP-*Signaling* sind die Rezeptorarme TSLPR und IL-7R α unabdingbar, für IL-7 müssen die IL-7R α Kette und die gemeinsame γ -Kette (γ_c) vorhanden sein, damit eine Tyrosin-Phosphorylierung stattfinden kann (Park et al., 2000). Erstere wurden in dieser Arbeit nachgewiesen und quantifiziert. Die Expression der gemeinsamen γ -Kette auf Monozyten wurde in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls überprüft

(nicht publizierte Daten) und ist in der Literatur bekannt (Leonard et al., 1995; Mazzucchelli & Durum, 2007; Sugamura et al., 1995).

In dieser Arbeit deuteten die Ergebnisse der pSTAT5 Messung bei frisch isolierten Monozyten darauf hin, dass TSLP nach stimulationsbedingter Hochregulierung an den entsprechenden Rezeptor bindet und eine Signaltransduktion bis zur Phosphorylierung des STAT5 Proteins auslöst. Dabei kann bei LPS-stimulierten Monozyten ein TSLP-titrationsabhängiger Effekt beobachtet werden, d.h. die pSTAT5 Induktion wird mit zunehmender Konzentration des hinzugegebenen TSLPs gesteigert. Somit liegen die vorliegenden Ergebnisse nah an denen der Arbeitsgruppe Borriello et al., 2017, die in ihrer Forschung eine TSLP-abhängige pSTAT5 Induktion von ca. 8% zeigten. Die simultane Hochregulation der TSLPR- und IL-7R α -Kette nach Stimulation zeigte sich zentral für die TSLP-Antwort in einer kleinen Subpopulation von Monozyten. Diese Subpopulation präsentierte mit der pSTAT5 Induktion nach TSLP-Stimulation auch einen erhöhten Prozentsatz der HLA-DR positiven Monozyten (Abb. 8).

Der Vergleich mit IL-7 ergab in der durchflusszytometrischen Messung eine geringe pSTAT5 Induktion auf primären Monozyten, die erwartungsgemäß nach LPS-Stimulation etwas höher lag als bei unstimulierten Zellen. Adankwah et al., 2021 analysierten den Phänotyp von Monozyten im Blut von Tuberkulosepatienten, asymptomatischen Kontaktpersonen und gesunden Kontrollpersonen aus Ghana mit und ohne IL-7 Stimulation mittels Durchflusszytometrie. Die Arbeitsgruppe fand auf Monozyten von Kontrollpersonen erhöhte pSTAT5-Spiegel nach IL-7 Stimulation, Kontaktpersonen hatten ebenfalls ein mäßig erhöhtes IL-7-induziertes pSTAT5. Diese Ergebnisse sind mit denen der vorliegenden Arbeit vereinbar.

4.2 IL-7R α positive Monozyten und Monozyten-Zelllinien reagieren nicht oder nur zu einem kleinen Teil auf IL-7

In der vorliegenden Arbeit ist klargeworden, dass die bereits vorher von Al-Mossawi et al. beschriebene stimulations-bedingte Überexpression des IL-7R α mit einer (deutlich geringeren) Koexpression des TSLPR einhergeht. Auch die erfolgreiche

Signaltransduktion konnte mittels durchflusszytometrischer pSTAT5-Messung für primäre Monozyten sowohl nach TSLP und IL-7 bestätigt werden. Diese lagen jedoch trotz deutlichem Unterschied der Rezeptorexpression etwa im gleichen Bereich von 2-4%. IL-7 induzierte insgesamt durchschnittlich etwas weniger pSTAT5 als TSLP.

Zhang et al., 2022 finden in ihrer Arbeit eine Hypersensitivität von IL-7 auf LPS aktivierte Monozyten, die eine hohe IL-7R Expression aufweisen (Zhang et al., 2022). Dennoch ist der relative Anteil des pSTAT5 von der Gesamtheit der STAT5 Proteine gering im Vergleich zu einer über 100%igen IL-7R-Expression nach LPS-Stimulation gemessen über qPCR.

Nachdem diese Beobachtungen festgehalten wurden, sollte in der vorliegenden Arbeit für den besseren Vergleich und Interpretation der Daten ein Verhältnis quantifiziert werden, das zeigt, wie viel Prozent Monozyten, die entweder IL-7R α besitzen und mit IL-7 stimuliert wurden oder den TSLPR Komplex exprimieren und mit TSLP stimulierbar waren, letztlich zur Induktion der STAT5-Phosphorylierung führen. Dazu wurde eine Formel aufgestellt (Kapitel 3.2.2), in der der Prozentsatz der pSTAT5 Induktion durch die entsprechende Rezeptorexpression geteilt wurde. Hierbei ist zu beachten, dass es sich nur um einen Orientierungs- oder Referenzwert handeln kann, da beide Komponenten jeweils separat an verschiedenen 96-wells-Platten gemessen wurden. Um Störfaktoren und *Bias* weitmöglichst zu umgehen, wurde die Platte für die pSTAT5 Messung und die Platte für die Rezeptorexpression gleichzeitig behandelt, alle Zellen mit dem Monozytenmarker HLA-DR gefärbt um bei der Auswertung und Analyse der Daten entsprechend nach diesem Marker zu *gaten*.

In Abb. 11 ist die Rekrutierung der TSLPR Komplexe in Form eines pSTAT5 positiven Anteils von allen TSLPR Komplex exprimierenden Monozyten dargestellt. Im Graphen wird deutlich, dass dieser relative Anteil mit zunehmender Konzentration von TSLP steigt und dabei bis ca. 200% reicht (wahre Rezeptorexpression durch durchflusszytometrische Messung und subjektivem Gating wahrscheinlich unterschätzt, daher Zahlen über 100%). So scheint eine TSLP gesteuerte pSTAT5 Induktion von 1-9% nicht viel, wenn man aber in Betracht zieht, dass der TSLPR

Komplex ohnehin nur zu 1-4% auf der Monozytenzelloberfläche gemessen wird, bedeutet dies, dass TSLP-Stimulation zu einer Rekrutierung von nahezu 100% der Rezeptoren führt, d.h. fast alle TSLPR Komplexe sensitiv auf das Zytokin reagieren und eine Signalkaskade auslösen.

Für IL-7 stellt es sich umgekehrt dar: obwohl eine Hochregulierung des Rezeptors von bis durchschnittlich 50% nachgewiesen wurde, zeigt sich eine pSTAT5 Induktion von nur ca. 3%. Damit ergibt sich eine pSTAT5/Rezeptorexpression-Relation für IL-7 bei primären Monozyten von ca. 3,8% (Abb. 11).

Diese IL-7 Hyposensitivität auf Monozyten ließ sich bei den Zelllinien bestätigen. Unsere Western Blot-Analysen zeigten PBMCs als funktionierende Positivkontrolle (Belarif et al., 2018) und waren somit für die Fragestellung einer TSLP- oder IL-7-gesteuerten Aktivierung der Monozyten-Zelllinien verwertbar. MonoMac 6 präsentierte sowohl nach IL-7 als auch TSLP-Gabe eine positive pSTAT5 Bande. Für Monomac 1 konnte Gleiches in abgeschwächter Form detektiert werden. Da aber für beide Zelllinien bereits ohne Zytokin eine pSTAT5 Induktion dargestellt wurde, und daher die Phosphorylierung mutmaßlich zytokinunabhängig und damit nicht im Sinne der Fragestellung erfolgte, wurde auf weitere Experimente und Interpretationen mit der MonoMac Zelllinie verzichtet. Ähnliche Ergebnisse der pSTAT5 Induktion auf MM1 und MM6 nach IL-7-Gabe können in der Masterthesis von Sabine Hellmuth aus unserer Arbeitsgruppe eingesehen werden. Insgesamt hat sich die Darstellung der JAK-Proteine und vor allem pJAK schwierig dargestellt. Die Herausforderung, JAK-Proteine als Zeichen einer erfolgreichen Signaltransduktion zu messen, spiegelt sich auch in der Literatur wider (Redhu & Gounni, 2012; Tal et al., 2014). Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit der Fokus für die Signaltransduktion auf die Phosphorylierung des STAT5 Proteins gelegt, die grundsätzlich eine erfolgreiche Phosphorylierung von JAK1 und 2 voraussetzt (Rochman et al., 2010).

Eine interessante Beobachtung konnte bei der Detektion der pSTAT5 Banden bei THP-1 Zellen gemacht werden: Es wurde zuvor gemessen und nachgewiesen, dass transduzierte cDNA-Zellen ausreichend IL-7R α und γ c auf der Oberfläche exprimieren (Masterarbeit „Charakterisierung der Interleukin-7 Rezeptor Expression und

Regulation unter Verwendung humaner Monozyten-Zelllinien“ von Sabine Hellmuth, 2021) und damit die Voraussetzung für die Dimerisierung des IL-7R nach IL-7 Bindung erfüllen. Bei der Charakterisierung des TSLPR Komplexes konnte eine geringe Expression auf cDNA-Zellen gemessen werden (Abb. 15). Trotzdem ist im Western Blot eine pSTAT5 Bande ausschließlich nach TSLP-Stimulation zu detektieren, nicht jedoch nach IL-7-Gabe. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei cDNA-THP-1 Zellen die Hochregulierung der IL-7R α -Kette einen Einfluss auf die Sensitivität für TSLP hat, wohingegen das IL-7 bei den Zellen keine Zellantwort in Form einer Phosphorylierung der Signalproteine auslösen kann.

Dass die Vektorkontrolle nach TSLP oder IL-7 Stimulation keine detektierbare Bande aufweist, entspricht der Erwartung, da keiner der erforderlichen Rezeptorarme an der Oberfläche exprimiert wird (Abb. 15).

Warum transduzierte Zellen keine Reaktion auf IL-7 geben, ist ungeklärt. Möglich wäre, dass Monozyten der Zelllinie zwar IL-7R α auf der Oberfläche ausreichend exprimieren, die Rezeptoren jedoch unter Umständen nicht funktionell sind. Da allerdings der TSLPR Komplex auch die α -Kette des IL-7R umfasst und dieser mit einer detektierbaren pSTAT5 Bande funktionell erscheint, wäre eine Überlegung, die gemeinsame- γ -Kette auf Funktionalität zu überprüfen. Eine weitere Vermutung könnte sein, dass IL-7 auf dieser Zelllinie nicht wie bei primären Monozyten über den bekannten JAK/STAT Signalweg transduziert, sondern über alternative Wege wie z.B. über Mitogen-assoziierte Proteinkinasen. Des Weiteren könnte eine Begründung sein, dass bei der Transduktion der Zelllinie möglicherweise die Rezeptorproteinstruktur etwas verändert ist, sodass die Affinität der Ligand-Rezeptorbindung bei IL-7 vermindert ist, wohingegen TSLP besser binden kann. Hierzu wäre es sinnvoll, mittels Proteinsequenzierung die genaue Aminosäuresequenz aufzuschlüsseln und diese mit derer frisch isolierter Monozyten zu vergleichen.

Mögliche Inhibitionsmechanismen der IL-7 Signaltransduktion werden von Sobah et al. und Luckey et al. beschrieben. SOCS3 und CISH sind Proteine der SOCS-Familie, die einen Einfluss auf die Aktivierung von Jak1 und 3 haben (Luckey et al., 2020; Sobah et al., 2021). In unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen SOCS3/CISH Hochregulierung und IL-7 Hyposensitivität

nachgewiesen werden (Dissertation „*Regulation of IL-7 receptor expression and the role of IL-7: Impact on monocyte phenotypes and antimicrobial effector functions*“ von Jean de Dieu Harelimana, 2023) Daraus lässt sich schließen, dass andere unbekannte Inhibitoren die geringe Empfindlichkeit von IL-7 auslösen könnten.

4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammengenommen legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die IL-7R α Hochregulierung nach Aktivierung einen Einfluss auf die Sensitivität von Monozyten für TSLP zeigt, während IL-7 kaum oder keine gesteigerte Signalantwort induzieren kann.

Es bleibt ein beachtlicher Teil an IL-7R α Expression auf Monozyten nach Stimulation, dessen Funktion bisher nicht hinreichend geklärt ist. Die Ausbildung des TSLPR Komplexes auf Monozyten nach Stimulation ist nur gering und kann nicht ausreichend die Funktion der IL-7R α Überexpression erklären. Hieraus ergibt sich, dass es noch weitere Funktionen für die Hochregulierung der α -Kette des IL-7R auf Monozyten geben muss als die Bindung von IL-7 oder TSLP, die in zukünftigen Studien untersucht werden müssen.

Zukünftige Arbeiten am TSLP-Rezeptor sollten erwägen, ein „*Sorting*“ der Monozyten vorzunehmen, um TSLPR $^+$ von TSLPR $^-$ Proportionen zu trennen und einen höheren Reinheitsgrad zu erreichen. Damit würden genauere Analysen und präzisere pSTAT5/Rezeptorexpression Relationen ermöglicht.

Um weitere TSLP-abhängige Effekte auf Monozyten und Monozyten-Zelllinien zu entziffern, wäre eine Phänotypisierung mittels Messungen verschiedener Oberflächenmarker wie z. B. CD40, CD11c, CD70, CD80 usw. sinnvoll. In dieser Arbeit wurde die Expression von CD11b und HLA-DR gemessen, die nach Stimulation hochreguliert wurden und für Reifung und Aktivierung der Monozyten sprechen (Lambert et al., 2017). Zur Visualisierung der verschiedenen Phänotypen eignen sich Algorithmen zur Reduktion der Dimensionalität wie z.B. *t-distributed stochastic neighbour embedding* (tSNE). So wäre die Möglichkeit gegeben, eine Charakterisierung der Monozytenphänotypen nach TSLP-Stimulation vorzunehmen, und diese mit Effekten von IL-7 auf Monozyten und Monozyten-Zelllinien zu vergleichen.

Als letzten Punkt wäre es für die Charakterisierung des TSLP-Rezeptors interessant, sich mit den Regulationsmechanismen zu befassen. Harelimana et al. untersuchten in ihrer Arbeit Regulationsmechanismen der IL-7R α -Expression auf Monozyten und beschrieben, dass für die vorübergehende IL-7R α -Expression auf MonoMac-Zelllinien und Monozyten eine konstitutive Forkhead box Protein (FoxO1) Expression erforderlich sei (Harelimana et al., 2022). Hier könnte sich die Frage ableiten, ob auch die stimulations-abhängige transiente TSLPR-Expression durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert wird, oder ob andere Proteine zur Regulation eine wichtige Rolle spielen.

5 Literatur und Quellenverzeichnis

- Adankwah, E., Harelimana, J. D., Minadzi, D., Aniagyei, W., Abass, M. K., Batsa Debrah, L., Owusu, D. O., Mayatepek, E., Phillips, R. O., & Jacobsen, M. (2021). Lower IL-7 Receptor Expression of Monocytes Impairs Antimycobacterial Effector Functions in Patients with Tuberculosis. *Journal of Immunology*, 206(10), 2430-2440. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001256>
- Al-Mossawi, H., Yager, N., Taylor, C. A., Lau, E., Danielli, S., de Wit, J., Gilchrist, J., Nassiri, I., Mahe, E. A., Lee, W., Rizvi, L., Makino, S., Cheeseman, J., Neville, M., Knight, J. C., Bowness, P., & Fairfax, B. P. (2019). Context-specific regulation of surface and soluble IL7R expression by an autoimmune risk allele. *Nature Communications*, 10(1), 4575. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12393-1>
- Allakhverdi, Z., Comeau, M. R., Jessup, H. K., Yoon, B. R., Brewer, A., Chartier, S., Paquette, N., Ziegler, S. F., Sarfati, M., & Delespesse, G. (2007). Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(2), 253-258. <https://doi.org/10.1084/jem.20062211>
- Arima, K., Watanabe, N., Hanabuchi, S., Chang, M., Sun, S. C., & Liu, Y. J. (2010). Distinct signal codes generate dendritic cell functional plasticity. *Sci Signal*, 3(105), ra4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000567>
- Bai, M., He, X., He, Y., Yuan, D., Jin, T., & Wang, L. (2019). IL-7R gene polymorphisms among patients with rheumatoid arthritis: A case-control study. *Mol Genet Genomic Med*, 7(7), e00738. <https://doi.org/10.1002/mgg3.738>
- Barata, J. T., Durum, S. K., & Seddon, B. (2019). Flip the coin: IL-7 and IL-7R in health and disease. *Nature Immunology*, 20(12), 1584-1593. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0479-x>
- Belarif, L., Mary, C., Jacquemont, L., Mai, H. L., Danger, R., Hervouet, J., Minault, D., Thepenier, V., Nerrière-Daguin, V., Nguyen, E., Pengam, S., Largy, E., Delobel, A., Martinet, B., Le Bas-Bernardet, S., Brouard, S., Soullillou, J. P., Degauque, N., Blancho, G., . . . Poirier, N. (2018). IL-7 receptor blockade blunts antigen-specific memory T cell responses and chronic inflammation in primates. *Nat Commun*, 9(1), 4483. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06804-y>
- Borriello, F., Iannone, R., Di Somma, S., Vastolo, V., Petrosino, G., Visconte, F., Raia, M., Scalia, G., Loffredo, S., Varricchi, G., Galdiero, M. R., Granata, F., Del Vecchio, L., Portella, G., & Marone, G. (2017). Lipopolysaccharide-Elicited TSLPR Expression Enriches a Functionally Discrete Subset of Human CD14(+) CD1c(+) Monocytes. *Journal of Immunology*, 198(9), 3426-3435. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601497>
- Braile, M., Fiorelli, A., Sorriento, D., Di Crescenzo, R. M., Galdiero, M. R., Marone, G., Santini, M., Varricchi, G., & Loffredo, S. (2021). Human Lung-Resident Macrophages Express and Are Targets of Thymic Stromal Lymphopoietin in the Tumor Microenvironment. *Cells*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/cells10082012>
- Chanput, W., Peters, V., & Wichers, H. (2015). THP-1 and U937 Cells. In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka,

- & H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (pp. 147-159). Springer
- Copyright 2015, The Author(s). https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_14
- Chen, Z., Kim, S. J., Chamberlain, N. D., Pickens, S. R., Volin, M. V., Volkov, S., Arami, S., Christman, J. W., Prabhakar, B. S., Swedler, W., Mehta, A., Sweiss, N., & Shahrara, S. (2013). The novel role of IL-7 ligation to IL-7 receptor in myeloid cells of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Journal of Immunology*, *190*(10), 5256-5266. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201675>
- Choa, R., Tohyama, J., Wada, S., Meng, H., Hu, J., Okumura, M., May, R. M., Robertson, T. F., Pai, R. L., Nace, A., Hopkins, C., Jacobsen, E. A., Haldar, M., FitzGerald, G. A., Behrens, E. M., Minn, A. J., Seale, P., Cotsarelis, G., Kim, B., . . . Kambayashi, T. (2021). Thymic stromal lymphopoietin induces adipose loss through sebum hypersecretion. *Science*, *373*(6554). <https://doi.org/10.1126/science.abd2893>
- Corren, J. (2019). New Targeted Therapies for Uncontrolled Asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract*, *7*(5), 1394-1403. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.03.022>
- Corren, J., Garcia Gil, E., Griffiths, J. M., Parnes, J. R., van der Merwe, R., Sařapa, K., & O'Quinn, S. (2021). Tezepelumab improves patient-reported outcomes in patients with severe, uncontrolled asthma in PATHWAY. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, *126*(2), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.10.008>
- Corren, J., Parnes, J. R., Wang, L., Mo, M., Roseti, S. L., Griffiths, J. M., & van der Merwe, R. (2017). Tezepelumab in Adults with Uncontrolled Asthma. *New England Journal of Medicine*, *377*(10), 936-946. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704064>
- Corren, J., & Ziegler, S. F. (2019). TSLP: from allergy to cancer. *Nature Immunology*, *20*(12), 1603-1609. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0524-9>
- Diver, S., Khalfaoui, L., Emson, C., Wenzel, S. E., Menzies-Gow, A., Wechsler, M. E., Johnston, J., Molfino, N., Parnes, J. R., Megally, A., Colice, G., & Brightling, C. E. (2021). Effect of tezepelumab on airway inflammatory cells, remodelling, and hyperresponsiveness in patients with moderate-to-severe uncontrolled asthma (CASCADE): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*, *9*(11), 1299-1312. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(21\)00226-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(21)00226-5)
- Friend, S. L., Hosier, S., Nelson, A., Foxworthe, D., Williams, D. E., & Farr, A. (1994). A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells. *Experimental Hematology*, *22*(3), 321-328.
- Gillissen, A. (2022). Biologika in der Asthmatherapie - was gibt es, was kommt? *Pneumo News*, *14*(2), 27-34. <https://doi.org/10.1007/s15033-022-2811-7>
- Gren, S. T., & Grip, O. (2016). Role of Monocytes and Intestinal Macrophages in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, *22*(8), 1992-1998. <https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000824>
- Harelimana, J. D., Ahor, H. S., Benner, B., Hellmuth, S., Adankwah, E., Minadzi, D., Aniagyei, W., Lamptey, M. N. K., Arthur, J., Yeboah, A., Abass, M. K., Debrah, L. B., Owusu, D. O., Mayatepek, E., Seyfarth, J., Phillips, R. O., & Jacobsen, M. (2022). Cytokine-induced transient monocyte IL-7Ra expression and the serum milieu in tuberculosis. *European Journal of Immunology*, *52*(6), 958-969. <https://doi.org/10.1002/eji.202149661>

- Hartgring, S. A., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P., & van Roon, J. A. (2006). Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *65 Suppl 3*(Suppl 3), iii69-74. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.058479>
- Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G. J., Watanabe, N., Qin, F. X., Yao, Z., Cao, W., & Liu, Y. J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(9), 1213-1223. <https://doi.org/10.1084/jem.20051135>
- Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, *2*(1), 1-5. <https://doi.org/10.4161/spmg.19885>
- Kerdiles, Y. M., Beisner, D. R., Tinoco, R., Dejean, A. S., Castrillon, D. H., DePinho, R. A., & Hedrick, S. M. (2009). Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nature Immunology*, *10*(2), 176-184. <https://doi.org/10.1038/ni.1689>
- Kim, S. J., Chang, H. J., Volin, M. V., Umar, S., Van Raemdonck, K., Chevalier, A., Palasiewicz, K., Christman, J. W., Volkov, S., Arami, S., Maz, M., Mehta, A., Zomorodi, R. K., Fox, D. A., Sweiss, N., & Shahrara, S. (2020). Macrophages are the primary effector cells in IL-7-induced arthritis. *Cellular & Molecular Immunology*, *17*(7), 728-740. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0235-z>
- Lambert, C., Preijers, F., Yanikkaya Demirel, G., & Sack, U. (2017). Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry. Part B: Clinical Cytometry*, *92*(3), 180-188. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21280>
- Lee, H. C., Headley, M. B., Loo, Y. M., Berlin, A., Gale, M., Jr., Debley, J. S., Lukacs, N. W., & Ziegler, S. F. (2012). Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(5), 1187-1196.e1185. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.031>
- Leichner, T. M., Satake, A., Harrison, V. S., Tanaka, Y., Archambault, A. S., Kim, B. S., Siracusa, M. C., Leonard, W. J., Naji, A., Wu, G. F., Artis, D., & Kambayashi, T. (2017). Skin-derived TSLP systemically expands regulatory T cells. *Journal of Autoimmunity*, *79*, 39-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.01.003>
- Leonard, W. J. (2002). TSLP: finally in the limelight. *Nature Immunology*, *3*(7), 605-607. <https://doi.org/10.1038/ni0702-605>
- Leonard, W. J., Shores, E. W., & Love, P. E. (1995). Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunological Reviews*, *148*, 97-114. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1995.tb00095.x>
- Liu, Y. J. (2006). Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(2), 269-273. <https://doi.org/10.1084/jem.20051745>
- Liu, Y. J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y. H., Malefyt Rde, W., Omori, M., Zhou, B., & Ziegler, S. F. (2007). TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annual Review of Immunology*, *25*, 193-219. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141718>
- Lu, N., Wang, Y. H., Wang, Y. H., Arima, K., Hanabuchi, S., & Liu, Y. J. (2009). TSLP and IL-7 use two different mechanisms to regulate human CD4+ T cell homeostasis. *Journal*

- of *Experimental Medicine*, 206(10), 2111-2119. <https://doi.org/10.1084/jem.20090153>
- Luckey, M. A., Kim, T. H., Prakhar, P., Keller, H. R., Crossman, A., Choi, S., Love, P. E., Walsh, S. T. R., & Park, J. H. (2020). SOCS3 is a suppressor of γ c cytokine signaling and constrains generation of murine Foxp3(+) regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 50(7), 986-999. <https://doi.org/10.1002/eji.201948307>
- Lundmark, F., Duvefelt, K., Iacobaeus, E., Kockum, I., Wallström, E., Khademi, M., Oturai, A., Ryder, L. P., Saarela, J., Harbo, H. F., Celius, E. G., Salter, H., Olsson, T., & Hillert, J. (2007). Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 39(9), 1108-1113. <https://doi.org/10.1038/ng2106>
- Lundtoft, C., Afum-Adjei Awuah, A., Rimpler, J., Harling, K., Nausch, N., Kohns, M., Adankwah, E., Lang, F., Olbrich, L., Mayatepek, E., Owusu-Dabo, E., & Jacobsen, M. (2017). Aberrant plasma IL-7 and soluble IL-7 receptor levels indicate impaired T-cell response to IL-7 in human tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 13(6), e1006425. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006425>
- Marković, I., & Savvides, S. N. (2020). Modulation of Signaling Mediated by TSLP and IL-7 in Inflammation, Autoimmune Diseases, and Cancer. *Frontiers in Immunology*, 11, 1557. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01557>
- Mazzucchelli, R., & Durum, S. K. (2007). Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nature Reviews: Immunology*, 7(2), 144-154. <https://doi.org/10.1038/nri2023>
- Miazgowiec, M. M., Elliott, M. S., Debley, J. S., & Ziegler, S. F. (2013). Respiratory syncytial virus induces functional thymic stromal lymphopoietin receptor in airway epithelial cells. *J Inflamm Res*, 6, 53-61. <https://doi.org/10.2147/jir.S42381>
- Milford, T. A., Su, R. J., Francis, O. L., Baez, I., Martinez, S. R., Coats, J. S., Weldon, A. J., Calderon, M. N., Nwosu, M. C., Botimer, A. R., Suterwala, B. T., Zhang, X. B., Morris, C. L., Weldon, D. J., Dovat, S., & Payne, K. J. (2016). TSLP or IL-7 provide an IL-7R α signal that is critical for human B lymphopoiesis. *European Journal of Immunology*, 46(9), 2155-2161. <https://doi.org/10.1002/eji.201646307>
- Numazaki, M., Abe, M., Hanaoka, K., Imamura, E., Maeda, M., Kimura, A., Miyanochara, J., Saito, T., Arai, K., Suzuki, H., & Saita, Y. (2022). ASP7266, a Novel Antibody against Human Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor for the Treatment of Allergic Diseases. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 380(1), 26-33. <https://doi.org/10.1124/jpet.121.000686>
- Pandey, A., Ozaki, K., Baumann, H., Levin, S. D., Puel, A., Farr, A. G., Ziegler, S. F., Leonard, W. J., & Lodish, H. F. (2000). Cloning of a receptor subunit required for signaling by thymic stromal lymphopoietin. *Nature Immunology*, 1(1), 59-64. <https://doi.org/10.1038/76923>
- Park, L. S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J. P., Muller, W., Largaespada, D. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Farr, A. G., Ziegler, S. F., Morrissey, P. J., Paxton, R., & Sims, J. E. (2000). Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 659-670. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.659>
- Quentmeier, H., Drexler, H. G., Fleckenstein, D., Zaborski, M., Armstrong, A., Sims, J. E., & Lyman, S. D. (2001). Cloning of human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) and

- signaling mechanisms leading to proliferation. *Leukemia*, 15(8), 1286-1292. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402175>
- Ray, R. J., Furlonger, C., Williams, D. E., & Paige, C. J. (1996). Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro. *European Journal of Immunology*, 26(1), 10-16. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260103>
- Reche, P. A., Soumelis, V., Gorman, D. M., Clifford, T., Liu, M., Travis, M., Zurawski, S. M., Johnston, J., Liu, Y. J., Spits, H., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A., & Bazan, J. F. (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *Journal of Immunology*, 167(1), 336-343. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.336>
- Redhu, N. S., & Gounni, A. S. (2012). Function and mechanisms of TSLP/TSLPR complex in asthma and COPD. *Clinical and Experimental Allergy*, 42(7), 994-1005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03919.x>
- Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G. W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K. U., & Leonard, W. J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19455-19460. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008271107>
- Shalova, I. N., Lim, J. Y., Chittechath, M., Zinkernagel, A. S., Beasley, F., Hernández-Jiménez, E., Toledano, V., Cubillos-Zapata, C., Rapisarda, A., Chen, J., Duan, K., Yang, H., Poidinger, M., Melillo, G., Nizet, V., Arnalich, F., López-Collazo, E., & Biswas, S. K. (2015). Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity*, 42(3), 484-498. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.001>
- Sims, J. E., Williams, D. E., Morrissey, P. J., Garka, K., Foxworthe, D., Price, V., Friend, S. L., Farr, A., Bedell, M. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Grabstein, K., & Paxton, R. J. (2000). Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor. *Journal of Experimental Medicine*, 192(5), 671-680. <https://doi.org/10.1084/jem.192.5.671>
- Sobah, M. L., Liongue, C., & Ward, A. C. (2021). SOCS Proteins in Immunity, Inflammatory Diseases, and Immune-Related Cancer. *Front Med (Lausanne)*, 8, 727987. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.727987>
- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., Waal-Malefyt, R. d., Bazan, F., Kastelein, R. A., & Liu, Y.-J. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunology*, 3(7), 673-680. <https://doi.org/10.1038/ni805>
- Standiford, T. J., Strieter, R. M., Allen, R. M., Burdick, M. D., & Kunkel, S. L. (1992). IL-7 up-regulates the expression of IL-8 from resting and stimulated human blood monocytes. *Journal of Immunology*, 149(6), 2035-2039. <https://www.jimmunol.org/content/149/6/2035.long>
- Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Nakamura, M., & Takeshita, T. (1995). The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. *Advances in Immunology*, 59, 225-277. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60632-x](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60632-x)

- Tal, N., Shochat, C., Geron, I., Bercovich, D., & Izraeli, S. (2014). Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(3), 365-378. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1337-x>
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26(2), 171-176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>
- Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Wang, Y. H., Cao, W., & Liu, Y. J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 436(7054), 1181-1185. <https://doi.org/10.1038/nature03886>
- Yona, S., & Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current Opinion in Hematology*, 17(1), 53-59. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283324f80>
- Zhang, B., Zhang, Y., Xiong, L., Li, Y., Zhang, Y., Zhao, J., Jiang, H., Li, C., Liu, Y., Liu, X., Liu, H., Ping, Y. F., Zhang, Q. C., Zhang, Z., Bian, X. W., Zhao, Y., & Hu, X. (2022). CD127 imprints functional heterogeneity to diversify monocyte responses in inflammatory diseases. *Journal of Experimental Medicine*, 219(2). <https://doi.org/10.1084/jem.20211191>
- Zhou, B., Comeau, M. R., De Smedt, T., Liggitt, H. D., Dahl, M. E., Lewis, D. B., Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D. J., & Ziegler, S. F. (2005). Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nature Immunology*, 6(10), 1047-1053. <https://doi.org/10.1038/ni1247>
- Ziegler, S. F. (2010). The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Current Opinion in Immunology*, 22(6), 795-799. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.10.020>
- Ziegler, S. F., Roan, F., Bell, B. D., Stoklasek, T. A., Kitajima, M., & Han, H. (2013). The biology of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). *Advances in Pharmacology*, 66, 129-155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404717-4.00004-4>
- Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., & Riethmuller, G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *International Journal of Cancer*, 41(3), 456-461. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910410324>

6 Anhang

Tabella 9: **Panel 1.**

Antikörper	Klon	Firma
TSLP Receptor Monoclonal Antibody	1A6	Invitrogen
APC Mouse IgG2a kappa Iso-type Control	eBM2a	Invitrogen
PE anti-human CD127 (IL-7Ra)	A019D5	Biolegend
IgG1-PE isotype control	MOPC-21	Biolegend
PE/Cyanine7 anti-human CD11b antibody	ICRF44	Biolegend

Tabella 10: **Panel 2.**

Antikörper	Klon	Firma
PerCP/Cyanine 5.5 anti-human HLA-DR	L243	Biolegend
Phospho-STAT5 (Tyr694) Monoclonal Antibody	SRBCZX	Thermo Fisher Scientific

7 Danksagung

Zunächst einmal möchte ich den größten Dank an meinen inspirierenden Doktorvater, Prof. Dr. Marc Jacobsen, für die großartige Betreuung und Förderung während meiner Forschungsreise aussprechen. Ohne sein Engagement und den regelmäßigen konstruktiven Rückmeldungen wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Co-Betreuerin Frau PD Dr. rer. Nat. Doreen M. Floß für die Betreuung während meiner Forschungszeit und der Einsicht meiner Arbeit bedanken.

Frau PD Dr. med. Julia Seyfarth danke ich für die wichtigen Anregungen für mein Forschungsprojekt und für die stets gute Stimmung in unseren Meetings und bei unseren Tagesausflügen.

Dr. Jean de Dieu Harelimana stand mir als bester Mentor und Supervisor seit Tag eins nicht nur im Labor immer zur Seite, auch persönlich fühlte ich mich unter seiner Betreuung wohl; Vielen Dank dafür.

Der gesamten Arbeitsgruppe Jacobsen bin ich zu großem Dank verpflichtet für die regelmäßige Unterstützung, einschließlich der derzeitigen und ehemaligen Kollegen: Ju-Young, Hubert, Sarah, Rebecca, Wilfred, Steffen, Maike, Yoshi, Souhaila und Katharina. Es war mir eine große Ehre, mit euch zu arbeiten. Euer Input war in jeglicher Sicht hilfreich, mit euch gibt es immer etwas zu lachen!

Vielen Dank an die Mitarbeiter des "Stoffwechsellabors", ich durfte eure technische Expertise und die gemütlichen Mittagspausen in der Küche schätzen lernen.

Mein Dank gilt auch der Medizinischen Fakultät der HHU, die uns die Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten im Labor erst ermöglicht.

Ein besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie, meinen Freunden und meinem Mann Muhammed-Ali. Ihre emotionale Unterstützung und Motivation, dranzubleiben, hat mir diese Reise erleichtert.