

# KAN PROTEASER I NÆRINGSMIDLAR (MJØLK) PÅVERKE UTVIKLING AV MATVAREALLERGI?

CAN PROTEASES IN FOOD AFFECT THE DEVELOPMENT OF FOOD ALLERGY?

LIVE HOLØ

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP  
INSTITUTT FOR KEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP  
MASTEROPPGAVE 60 STP. 2011





# Forord

Arbeidet på masteroppgåva vart utført i gruppa for molekylær cellebiologi ved institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

Eg vil gjerne få takke min hovudveileidar professor Tor Lea for god veiledning under arbeidet med oppgåva.

Eg vil og takka Charlotte R. Kleiveland og Lene Therese O. Hult for god opplæring i celloarbeid og for hjelp og svar på alle moglege spørsmål.

Vil og rette ein stor takk til resten av gruppa for eit interessant og lærerikt år.

Eg vil og takke pappa som alltid har støtta og oppmuntra meg under utdanninga.

Ås, desember 2011

---

Live Holø

# Innhald

<b>Samandrag</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Forkortingar</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 Allergi.....	1
1.1.1 Allergen.....	2
1.1.2 Matvareallergi.....	3
1.1.3 Mekanismar i utvikling av allergi.....	4
1.2 Basofile granulocytter og utvikling av allergi.....	5
1.2.1 Utvikling av basofile granulocytter.....	6
1.2.2 Basofile granulocytter induserer T <sub>H</sub> 2 respons når eksponert for proteaseallergen.....	7
1.2.3 Basofile granulocytter som antigenpresenterande celler.....	7
1.2.4 TSLP kan indusere produksjon av ein annan populasjon av basofile granulocytter.....	10
1.2.5 Aktiveringsmarkørar for basofile granulocytter.....	10
1.3 Proteaseaktiverte reseptorar (PAR).....	11
1.3.1 Aktivering av PAR.....	11
1.3.2 Andre proteaser som kan aktivere PAR.....	12
1.3.3 Signalering gjennom PAR.....	12
1.3.4 PAR og allergi.....	13
1.4 Serinproteaser i mjølk.....	14
1.4.1 Plasminsystemet.....	14
1.4.2 Lysosomale proteaser.....	16
1.4.3 Proteaser produsert av psykrotrofe bakteriar.....	16
1.5 Mål med oppgåva.....	17
<b>2 Materiale</b> .....	<b>18</b>
2.1 Utstyr og instrument.....	18
2.2 Kjemikalie.....	19
2.3 Medie og løysningar.....	20
2.4 Antistoff og partiklar kopla til antistoff.....	20
2.5 Primere.....	20
2.6 Kit.....	20
2.7 Oppskrifter.....	21
2.7.1 Arbeid med celler.....	21
2.7.2 Stimulering av celler.....	21
2.7.3 SDS-PAGE og western blotting.....	21
2.7.4 Isolering av basofile celler.....	24
<b>3 Metodar</b> .....	<b>25</b>
3.1 Celloarbeid.....	25
3.1.1 Celledyrking.....	25
3.1.2 Innfrysing av celler.....	25
3.1.3 Tining av celler.....	26
3.2 Real time polymerase kjedereaksjon (qPCR).....	26
3.2 Stimulering av celler.....	27
3.3 Lysing av celler.....	28
3.4 SDS-PAGE.....	28
3.5 Western blotting.....	29
3.6 Påvising av CD63 uttrykk ved hjelp av væskestrømscytometri.....	30
3.7 Isolering av basofile granulocytter.....	31

3.7.1 Tillaging av gradient.....	31
3.7.2 Påvising av T-celler, B-celler og basofile granulocytter tilstede i isolert cellefraksjon ved hjelp av væskestrømscyometri.....	31
3.7.3 Negativ seleksjon (Fjerning av T-celler).....	32
3.7.4 Positiv seleksjon av basofile granulocytter.....	32
<b>4 Resultat.....</b>	<b>33</b>
4.1 Påvisning av mRNA for PAR reseptorar i KU812 celler.....	33
4.2 Effekt av dei syntetiske peptida AP-PAR1, AP-PAR2 og AP-PAR4 på fosforyleringa av Erk.....	34
4.3 Stimulering med trypsin gir aktivering av Erk.....	35
4.4 Effekten av plasmin på aktiveringa av Erk.....	36
4.5 Isolering av basofile frå fullblod.....	37
4.6 qPCR på mRNA frå primærceller.....	38
4.7 Effekt av trypsin og plasmin på CD63 uttrykksnivå.....	40
<b>5 Diskusjon.....</b>	<b>42</b>
<b>6 Referanser.....</b>	<b>47</b>

## Samandrag

Basofile granulocytter har lenge vore kjent for deira funksjon som effektorceller i type 1 hypersensitivitetsreaksjonar. Nyare studie har vist at basofile granulocytter kan inducere  $T_H2$ -mediert immunrespons når dei er eksponert for allergen med cystein eller serinprotease aktivitet. Proteaseaktiverte reseptorar (PAR) er plasmamembranreseptorar som vert aktivert ved proteolytisk kløyving av serinproteaser. PAR er uttrykt av på både immunceller og andre celletypar som t.d. tarmepitelceller. Mjølkk inneheld fleire serinproteaser, der plasmin er den som er best studert. Ei rekkje luftvegsallergen har vist seg å ha proteaseaktivitet, dei fleste studia på effekten av proteaseallergen på basofile granulocytter er difor utført i ein modell for luftvegsallergi. Førekomsten av allergi mot matvarer aukar og i denne oppgåva vart det difor undersøkt om proteaser i næringsmidlar, og spesielt i mjølk kan utøve ei effekt på basofile granulocytter og om denne effekten er mediert via PAR.

I innleiande forsøk vart det isolert mRNA frå den basofile cellelinen KU812. Ved qPCR vart det påvist mRNA for PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4. Det vart vidare påvist funksjonelle reseptorar for PAR1, PAR2 og PAR4 ved stimuleringsforsøk med spesifikke aktiverande peptid (AP) for desse reseptorane. Resultata viste at AP1, AP2 og AP4 induserte fosforylering av Erk. Det vart og utført stimuleringsforsøk med trypsin og plasmin på KU812 celler. Det vart vist at trypsin og plasmin induserte fosforylering av Erk i KU812 celler. Dette er det fyrste gong det vert undersøkt kva til effekt proteaser i mat har på basofile granulocytter

Det vart og isolert basofile granulocytter frå humant fullblod på to ulike måtar. Primære basofiler isolert ved gradientsentrifugering kombinert med positiv seleksjon med monoklonalt anti-  $Fc\epsilon RI$  antistoff inneheldt mRNA for PAR1, PAR2 og PAR3.

CD63 er ein markør som vert uttrykt av basofile granulocytter etter at dei er aktivert . I basofilaktiveringstest er CD63 nytta som aktiveringsmarkør for å påvise IgE-medierte reaksjonar mot ulike allergen. Det vart difor undersøkt om stimulering med trypsin og plasmin induserte uttrykk i plasmamembranen av CD63 i KU812 og i primærceller. Resultata frå dette forsøket viste at trypsin og plasmin ikkje induserte uttrykk CD63.

## Abstract

The role of basophils as effector cells during type 1 hypersensitivity reactions are well known. Recent studies have shown that basophils also can induce  $T_H2$  mediated immune responses when exposed to protease allergens. Protease activated receptors (PAR) belong to a family of G-protein coupled receptors that are activated by serine proteases. PAR is expressed in both immune cells and other cell types as human intestinal epidermal cells. Milk contains several serine proteases, of which plasmin is the best characterized among them. Most of the studies on the effects of protease allergens on basophils are performed in a model mimicking airway allergy. In this project it was hypothesized that proteases from food also may exert an effect on basophils and that PAR may be the target molecule cleaved by these proteases.

Introductory experiment showed that mRNA for all PAR receptors was expressed in the KU812 cell line. Stimulation with activating peptide for PAR1, PAR2 and PAR4 showed that the mRNA was expressed as functionally receptors in KU812. It was also performed experiments with trypsin and plasmin in which both were shown to activate Erk. This is the first experiment that elucidates the possible effect of food proteases on basophils.

It was also isolated basophils from human whole blood in two different ways. Primary basophils isolated by gradient centrifugation combined with positive selection with monoclonal anti-FcεRI antibody expressed mRNA for PAR1, PAR2 and PAR3.

CD63 is a membrane protein that is expressed by activated basophils. CD63 is used as an activation marker in basophil activation tests for detection of IgE-mediated reactions against different allergens. It was also performed an experiment where the effect of stimulation of plasmin and trypsin on CD63 expression in KU812 cells and primary cells were investigated. The results from these experiments showed that trypsin and plasmin did not induce increased expression of CD63.

## Forkortingar

Forkorting	Forklaring
AP	Aktiverande peptid
APC	Antigenpresenterande celler
APS	Ammonium persulfat
BaP	Basofil forløpar
BAT	Basofil aktiveringstest
BMCP	Basofil/mastcelle forløpar
Ct	Syklusgrenseverdi
$\Delta$ Ct	Endring i syklusgrenseverdi
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EoP	Eosinofil forløpar
Erk	Ekstracellulære signalregulerte kinaser
Fc $\epsilon$ RI	Fcepsilon reseptor I (Høgaffinitetsreseptor for IgE)
FITC	Fluorescein isothiocyant
fMLP	N-Formyl-Metionin-leucin-fenylalanin
GAPDH	Glyseraldehyd-3-fosfat dehydrogenase
GATA-3	GATAbindande protein3
GDP	Guanindifosfat
GEF	Guanin utvekslingsfaktor
GM-CSF	Granulocytt-makrofag kolonistimulerande faktor
GPCR	G-proteinkopplareseptor
GTP	Guanin trifosfat
HBSS	Hanks balanserte saltløyning
HCl	Hydrogenklorid
HLA	Hovudvevsforlikheitsantigene
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfat
JNK	c-Jun aminoterminal kinase
mA	Milliampere
MAP kinase	Mitogenaktivererte proteinkinaser
Mek	MAPK kinase
mRNA	Bodbringer RNA
NF $\kappa$ B	Nukleærfaktor kappa-B
p38	p38 mitogenaktivert kinase
PA	Protease aktivator
PAI	Proteaseaktivator inhibitor
PAR	Proteaseaktivert reseptor
PBS	Fosfatbufra saltvatn
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidylinositol 4,5-bifosfat
PVDF	Polivinylden difluorid-membran
qPCR	Realtime polymerase kjedereaksjon
Raf	MAPK kinase kinase
RTK	Reseptortyrosinkinase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektrofores
STAT6	Signaloverfører og aktivator av transkripsjon 6



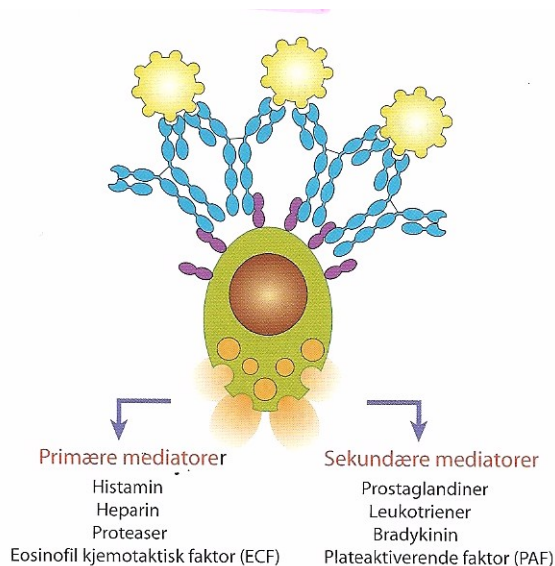
TBS	Trisbufra saltvatn
TCR	T-celle reseptor
T <sub>H</sub> 1	T-hjelpecelle 1
T <sub>H</sub> 2	T-hjelpecelle 2
TSLP	Thymic lymfopoietin protein

# 1 Introduksjon

## 1.1 Allergi

Allergi kjem frå det greske ordet "allos ergos" som tyder endra reaktivitet (Lea, 2006).

Det inneber at ein allergisk reaksjon skjer ved andre gongs eksponering mot ein allergiframkallande forbindelse. Eit individ må altså verte sensibilisert mot den allergiframkallande forbindelsen slik at det dannast eit reaksjonsmønster som etter kvart kan uttrykkast i ein immunrespons. Ved IgE-mediert allergi vil det ved fyrste gongs immunisering verte utvikla ein T-hjelpe celle 2 ( $T_{H2}$ )-immunrespons mot antigenet, der  $T_{H2}$  cellene skil ut cytokin som induserer eit skifte i antistoffproduksjonen til IgE i B-celler. Desse IgE antistoffa vil deretter binde seg på  $Fc\epsilon$ -reseptorar som er uttrykt på overflaten av basofile granulocytar og mastceller. Den vanlegaste typen av allergi er type1 hypersensitivitet (straksreaksjon). Denne reaksjonen er karakterisert ved at multivalente allergen kryssbind  $Fc\epsilon$ -reseptorar på mastceller og basofile granulocytar ved hjelp av allergenspesifikt IgE (figur 1). Dette fører til at det vert danna eit intracellulært signal som fører til at cellene skil ut histamin, og andre betennelsesframkallande forbindelsar. Histamin bind til H1 og H2 reseptorar på nærliggjande celler. Aktivering av H1-reseptor fører til samantrekningar i glatt muskulatur i tarm og lunger, auka karpermabilitet og auka slimutskil frå slimproduserande celler. Seinare i aktiveringsfasen frigir cellene prostaglandin D2 og leukotrien som vert syntetisert av fosfolipid. Desse verkar ved å auke karpermabiliteten i blodkara i tillegg induserer dei samantrekningar i glatte muskel celler (Lea 2006).



**Figur 1:** Figuren viser antigenmediert kryssbinding av FcεRI på mastceller. Denne kryssbindinga fører til at mastcellen degranulerer og skil ut betennelsesframkallande faktorar. Faktorar som er skilt ut med eingong er kalla primære mediatorar, desse er ferdig syntetisert og lagra i vesiklar inne i cellen. Forbindelsar som er syntetisert etter aktivering er kalla sekundære mediatorar. Desse har ein meir langvarig verknad enn dei primære mediatorane (Lea 2006).

Utvikling av allergi skuldast både genetiske faktorar og miljøfaktorar. Nokre individ er meir predisponert for å utvikle allergi enn andre, dette fordi dei produserer IgE antistoff mot ”harmlose”, ikkje-infeksiøse agens der friske individ vanlegvis produserer antistoff av IgM-, IgA- eller IgG-klasse. Med den høge førekomsten som er sett i vestlege land i dag er det truleg at og miljøet spelar ei stor rolle (Yazdanbakhsh et al. 2002).

### 1.1.1 Allergen

Ikkje- infeksiøse agensar som vi til dagleg er utsatt for i miljøet rundt oss og som utløysar ein allergisk reaksjon vert kalla allergen. Det er berre ein liten del av det som oppfattast som eit allergen som verkar allergent. For eksempel hjå husstøvmidd er det middens avføring som inneheld dei allergene komponentane. Desse kan innehalde fleire ulike epitopar som kan utløyse allergi. Allergen som utløysar IgE-mediert allergi er proteinforbindelsar og i følgje verdas helseorganisasjon (WHO) er eit protein lista som allergen dersom det forårsakar spesifikk IgE-antistoff respons i minst 5 individ (Chapman et al. 2007). Dei fleste allergenmolekylla som utløysar IgE-mediert immunrespons kjem frå plantar, sopp og dyr og har vanlegvis ein spesifikk funksjon i organismen dei kjem frå. Eksponering mot allergen skjer på kroppens slimhinner, og då særleg gjennom mage-tarm regionen og luftvegane. For

at allergenet skal kunne utløyse ein allergisk respons må det kunne krysse barriereoverflater som skil kroppens kontakt med det ytre frå det indre, og kome i kontakt med det lokale immunforsvaret.

Allergen vert klassifisert som fullstendige dersom dei har eigenskapar som gjer at dei kan indusere immunsystemet til å produsere høgaffinitetsantistoff og i tillegg kan utløyse ein allergisk reaksjon ved repetert immunisering. Allergen som ikkje verkar immunogent men som berre kan kryssreagere med allereie danna IgE-antistoff vert klassifisert som eit ufullstendig antigen (Aalberse 2000). Generelt er det slik at låg dose av allergenet fører til utvikling av IgE og allergi, medan ei høg dose av allergenet fører til utvikling av regulatoriske T-celler og produksjon av immunoglobulin G (IgG). Ein trur at allergen dose har ei effekt på funksjonen til effektor celler som til dømes dendritiske celler. Slike effektorar kan vere auka apoptose av IL-4 produserande T-celler og ein endra cytokinprofil som favoriserer toleranse (Riedl et al. 2005). I tillegg til dosen av det tilgjengelege allergenet, har og styrken på signalet som vert gjeve til T-celler noko å seie. Hovudvevsforlikheitsantigene (HLA)-haplotype variabilitet mellom individ, fører til at nokre individ kan ha HLA klasse II molekyl som bind sterkt til peptidet og på den måten utøver eit sterkt signal, medan andre kan ha lågaffinitets HLA molekyl (Blaser et al. 1998).

### 1.1.2 Matvareallergi

Det er mange som reagerer på matvareallergen og allergi mot matvarer har vorte meir og meir utbreidd. Vanlegast er allergi mot nøtter, skaldyr, fisk, egg, mjølk, kveitemjøl og frukt. Berre ein liten del av dei proteina som vert innteke gjennom maten fører til utvikling av allergi.

Type1 hypersensitivitet er vanlegast ved matvareallergi. Normalt er det utvikla toleranse mot alle dei ulike komponentane som er i matvarer. I følgje ein oversiktsartikkel (Sampson et al. 2004) er epitelcellene i slimhinneoverflatene og andre APC som dendritiske celler viktige i utvikling av oral toleranse. Eitelcellene tek opp antigen og presenterer dei for T-celler, men manglar kostimulerande molekyl, noko som fører til at T-cellene ikkje får signal 2.

Dendritiske celler som er lokalisert i tarmområde kan verte påverka av ulike vekstfaktorar skilt ut av celler i nærleiken til å produsere IL-10. IL-10 er eit cytokin som er viktig i nedregulering av både  $T_H1$  og  $T_H2$ -mediert immunrespons (Sampson 2004). I tillegg er det trudd at bakteriar som er ein naturleg del av tarmfloraen, såkalla kkommensalar, er viktige i

utviklinga av toleranse. Mange av matvareallergena har vore utsett for ei form for prosessering, noko som kan endre deira allergene eigenskapar. I tillegg er dei utsatt for låg pH, og ulike enzym i mage-tarmkanalen som kan endre deira funksjonelle, strukturelle og biokjemiske eigenskapar. Pasteurisering av mjølkeproteina  $\alpha$ -laktalbumin og  $\beta$ -laktglobulin fører til at desse proteina klumpar seg saman til polymerar. Dette kan føre til at deira evne til å sensibilisere eit individ aukar, ved at dei i staden for å verte teke opp av absorptive enterocytter heller vert teke opp via Peyerske flekkar (Roth-Walter et al. 2008). Allergen opptak via Peyerske flekkar er vist å indusere høgare antistoff og cytokin produksjon. Peyerske flekkar er samlingar av T- og B-lymfocytter som er lokalisert under tarmens slimhinner. Kasein er den komponenten i mjølk som har viser seg å ha størst immunogenisitet, denne er ikkje påverka av pasteurisering eller andre temperaturbehandlingar (Roth-Walter et al. 2008).

### 1.1.3 Mekanismar i utvikling av allergi

Med den auka førekomsten av allergiske sjukdommar i vestlege land dei siste tiåra er det stor interesse i å forstå mekanismene som fører til utvikling av allergi.

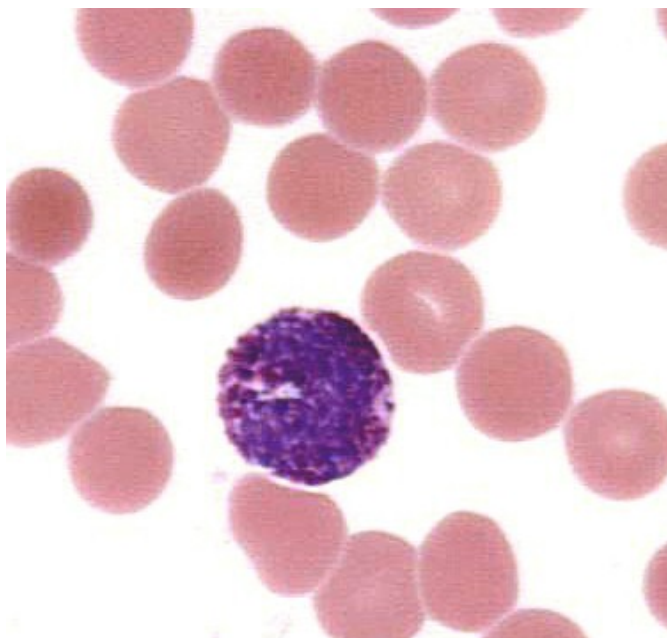
Det er trudd at  $T_H2$  immunrespons mot allergen er ein feil veg som opphavleg er utvikla for å beskytte mot parasittinfeksjon. Parasittar skil ut proteaser som er viktig i infeksjonssyklusen og desse er kjent att av sensorar på celler som inngår i det medfødde immunforsvaret. Dette fører til at det vert utvikla antigenpresenterande celler (APC) som påverkar utviklinga av  $CD4$  positive ( $CD4^+$ ) T-celler i retning av  $T_H2$  celler (Sokol et al. 2008).

Fleire allergen har cystein- eller serinproteaseaktivitet og det er vist at proteaseaktiviteten er viktig for utvikling av allergi. Det er fleire teoriar for korleis proteaser påverkar immunsystemet til å utvikle ein  $T_H2$  respons som induserer skifte i antistoffproduksjonen i retning IgE. Den eine er at proteaser kan auke mengda av bindingar som kryssar epitelcellelaget via kløyving av viktige molekyl som held epitelcellene saman. Eit eksempel er Der p1 allergenet frå husstøvmidd *Dermatophagoides pteronyssinus* som er vist å kunne kløyve "tight junctions" mellom epitelceller i luftvegane (Wan et al. 1999). Det er vist at proteaser frå midd, sopp og kakerlakkar kan stimulere til auka uttrykk av cytokin, som for eksempel IL-6, IL-8 og granulocyt-makrofag kolonistimulerande faktor (GM-CSF). Dendritiske celler som er modna i nærvær av proteolytisk aktivt Der p1 induserer auka produksjon av IL-4 og mindre interferon gamma ( $IFN-\gamma$ ) hjå  $CD4^+$  T-celler, noko som kan

føre til at  $T_H2$  respons vert favorisert (Ghaemmaghami et al. 2002). I tillegg kan allergen med proteaseaktivitet indusere  $T_H2$ -immunrespons via deira verknad på basofile granulocytter (Sokol et al. 2008; Sokol et al. 2009).

## 1.2 Basofile granulocytter og utvikling av allergi

Basofile granulocytter er celler som inngår i det medfødde immunforvaret, og dei utgjer berre ein liten fraksjon (1%) av sirkulerande leukocytter i blod. Denne celletypen vart oppdaga av den tyske forskaren Paul Erlich i 1879. Basofile granulocytter inneheld granula, og namnet kjem frå at dei kan fargast med basiske fargestoff (figur 2).

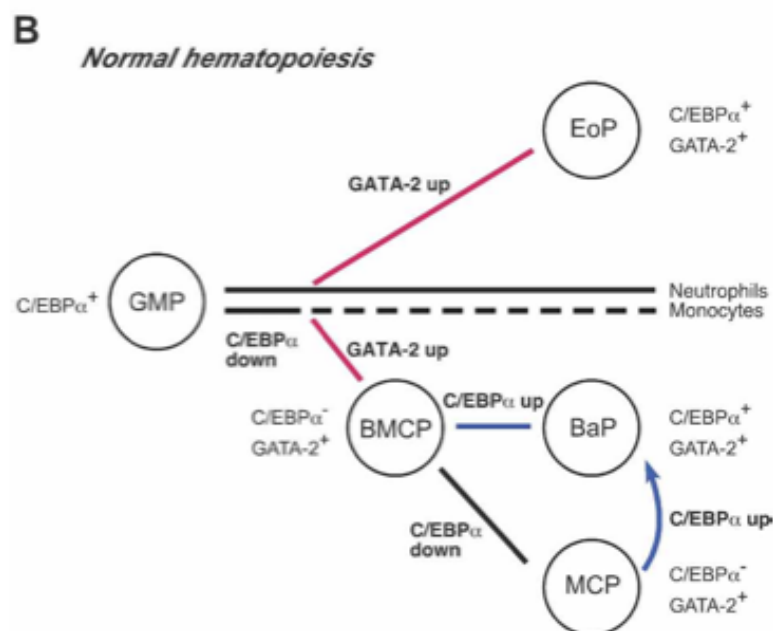


**Figur 2:** Figuren viser eit bilete av ein basofil granulocytt som er farga med basiske fargestoff. Dei lillafarga granula dekkjer for kjernen som ser ut som den er i fleire delar (Microanatomy. 2004).

Basofile granulocytter og mastceller liknar kvarandre i at begge uttrykkjer IgE høgaffinitetsreseptoren  $Fc\epsilon RI$  og ved antigenmediert aktivering av reseptoren skil begge celletypene ut histamin og andre betennelsesframkallande forbindelsar. Det har difor lenge vore trudd at desse to cellene utøvde nesten dei same funksjonane, men nyare forskning tyder på at basofile har ei meir framstående rolle, særleg i induksjon av  $T_H2$  mediert immunrespons respons mot parasittar og i utvikling av allergi (Sokol et al. 2008; Sokol et al. 2009).

### 1.2.1 Utvikling av basofile granulocytter

Basofile granulocytter, eosinofile granulocytter og mastceller stammer frå same forløpar i beinmergen, granulocytt/monocytt forløpar (GMP). GMP kan vidare gi opphav til eosinofil forløpar (EoP) og basofil/mastcelle forløpar (BMCP). BMCP kan utvikle seg til basofil forløpar (BaP) og mastcelle forløpar (MCP) (Arinobu et al. 2005; Iwasaki et al. 2006). Om GMP gir opphav til EoP eller BMCP er avhengig av uttrykksnivået av transkripsjonsfaktorane GATA bindande protein 2 (GATA2) og CCAAT/enhancer bindande protein (C/EBP $\alpha$ ) (figur 3). På same måte styrer uttrykket av desse to transkripsjonsfaktorane om BMCP gir opphav til BaP eller MCP (Arinobu et al. 2005; Iwasaki & Akashi 2007).



**Figur 3:** Utvikling av basofile frå stamceller i beinmergen. EoP og BMCP utvikling kan verte instruert ved oppregulering av transkripsjonsfaktoren GATA-2, ved uttrykk av transkripsjonsfaktoren C/EBP $\alpha$  samtidig vil GMP gi opphav til EoP. GMP vil utvikle seg til BMCP dersom C/EBP $\alpha$  er undertrykt. For at BMCP skal utvikle seg til BaP må uttrykket av C/EBP $\alpha$  reaktiverast (Iwasaki et al. 2006).

Basofile og eosinofile granulocytter differensierer ferdig til modne celler i beinmergen, medan mastceller migrerer som umodne celler til perifert vev og fullfører differensieringa der (Galli 2000). Basofile granulocytter er normalt ikkje funne i vev, men kan verte rekruttert til vev under betennelses eller infeksjonstilstandar. IL-3 stimulerer til auka produksjon av basofile i mus infisert med helminten *Strongylorides venezuelensis*, men fråvær av IL-3 påverkar ikkje grunnivået av basofile produsert under fysiologiske forhold (Lantz et al. 1998; Ohmori et al. 2009; Shen et al. 2008). Aktiverte T-celler er hovudkjelda til IL-3, som

stimulerer til auka produksjonen av basofile granulocytter under parasittinfeksjonar (Shen et al. 2008). IL-3 er og involvert i overleving og rekruttering av basofile til drenerande lymfeknutar (Kim et al. 2010).

### **1.2.2 Basofile granulocytter induserer T<sub>H</sub>2 respons når eksponert for proteaseallergen**

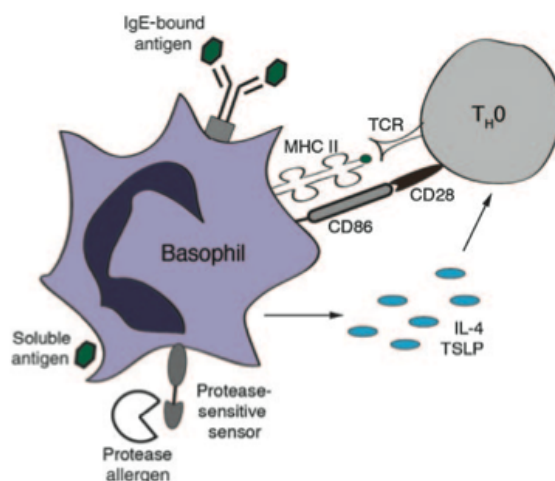
Kryssbinding av FcεRI på basofile granulocytter induserer utskiljing av histamin, andre proinflammatoriske forbindelsar og type 2 cytokin. Basofile granulocytter kan og aktiverast direkte av cytokina IL-3 og IL-18 eller IL-33 (Hida et al. 2008; Kroeger et al. 2009; Pecaric-Petkovic et al. 2009). Proteaseallergen kan og aktivere basofile granulocytter direkte, slik at dei byrjar å produsere og skilje ut IL-4. IL-4 er eit cytokin som induserer differensiering av CD4<sup>+</sup> T-celler til T<sub>H</sub>2 via aktivering av transkripsjonsfaktorane Signaloverfører og aktivator av transkripsjon 6 (STAT6) og GATA3. Desse to transkripsjonsfaktorane fremjar syntese av IL-4, IL-5 og IL-13. Sokol et al. har gjennom sine studie vist at cysteinproteasen papain aktiverer basofile granulocytter via ein ukjent sensor, og at aktiverte basofile granulocytter skil ut cytokina IL-2, IL-4, IL-13, IL-31 og ”thymic stromal lymfopoietin” (TSLP). I tillegg er dei rekruttert til T-cellesonen i drenerande lymfeknutar (Sokol et al. 2008). Papain er eit allergen, som er vist å føre til astma hjå industriarbeidarar som driv med foredling av kjøtt (Novey et al. 1979). Responsar som følgje av direkte aktivering av basofile granulocytter skjer utan degranulering, dette er i motsetning til kryssbinding av FcεRI, som fører til at basofile skil ut betennelsesframkallande faktorar som histamin og leukotrien C4 (Sokol et al. 2008). Andre proteaser kan og aktivere basofile granulocytter, proteasene Der p1 frå husstøvmiddet *Dermatophagoides pteronyssinus* og ES frå *Necator americanus* stimulerer KU812 cellelinen til å skilje ut IL-4 og IL-13. Det er og vist at Der p1 aktiverer humane primære basofile granulocytter til å produsere og skilje ut type 2 cytokin (Phillips 2003).

### **1.2.3 Basofile granulocytter som antigenpresenterande celler**

APC kan ta opp, prosessere og presentere antigen som kompleks av HLA II og peptid for CD4<sup>+</sup> T-celler. I tre uavhengige studie er det vist at basofile granulocytter kan fungere som APC i T<sub>H</sub>2 immunitet. Dei tre gruppene har nytta ulike testsystem for induksjon av T<sub>H</sub>2 immunrespons: papainmediert, antigen-IgE-mediert og respons på infeksjon frå helmintar. Alle gruppene viste at basofile granulocytter uttrykkjer HLA klasse II, i tillegg til dei



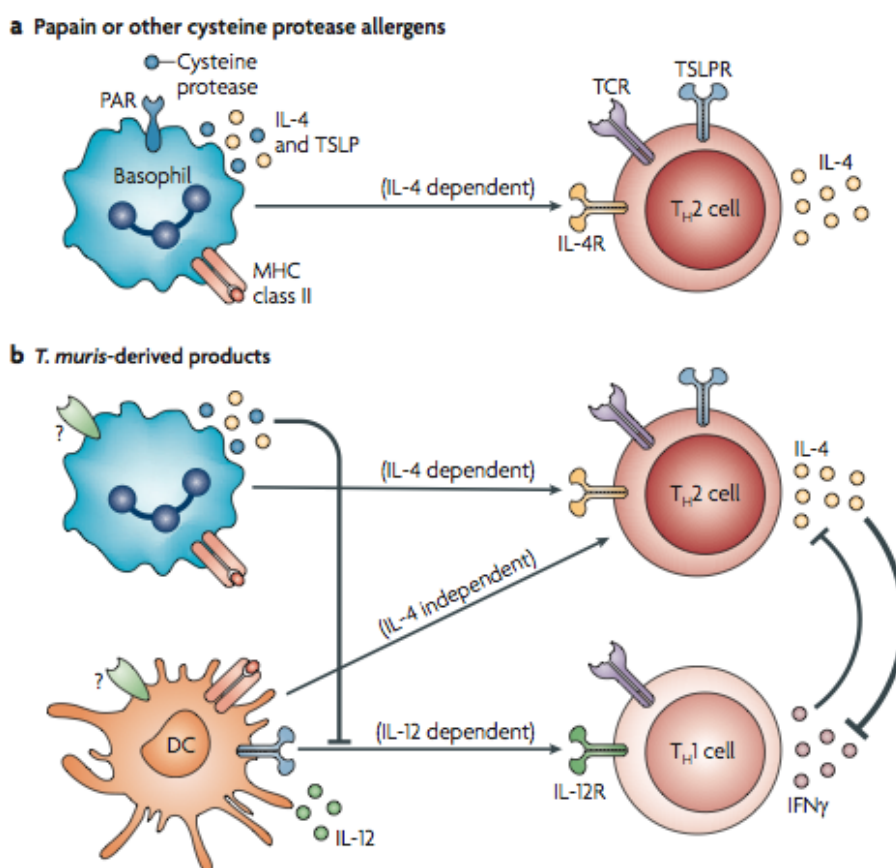
kostimulerande molekyla CD80 eller CD86 og CD40 (Perrigoue et al. 2009; Sokol et al. 2009; Yoshimoto et al. 2009). Ved papainmediert  $T_H2$  differensiering er det funne auka uttrykk av desse molekyla på aktiverte basofile granulocytter i lymfeknutane (Sokol et al. 2009). Basofile granulocytter kan ta opp løyselege antigen, prosessere dei og presentere dei i HLA klasse II etter papainindusert aktivering (figur 4). Partikulære antigen kan berre takast opp i form av antigen-IgE kompleks (Sokol et al. 2009). Etter immunisering med proteaseallergen, utskilte produkt frå parasittar eller heile helmintar bevegar basofile granulocytter seg til drenerande lymfeknute, der dei kan presentere antigen for naive T-celler og indusere utviklinga av  $T_H2$  immunrespons (Sokol et al.2009) .



**Figur 4: Basofile granulocytter kan aktiverast av protease allergen som kløyver eit ukjent målprotein på membranoverflaten, eller ved IgE-mediert kryssbinding. Basofile kan ta opp partikulære antigen via  $Fc\epsilon RI$ -mediert opptak eller endocytosere løyselege antigen. Antigena er bearbeida og presentert i HLA klasse II molekyl. I tillegg uttrykkjer aktiverte basofile granulocytter dei kostimulerande molekyla CD80/86 og CD40. Dermed kan dei fungere som APC for naive T-celler og indusere utvikling av  $T_H2$  celler. Aktiverte basofile granulocytter skil og ut cytokina IL-4 og TSLP som vidare fremjar utvikling av  $T_H2$  celler (Sokol & Medzhitov 2010).**

Andre APC, spesielt dendrittiske celler kan og indusere  $T_H2$  responsar. Basofile granulocytter ser ut til å berre kunne fremje utvikling av  $T_H2$  celler, medan dendrittiske celler kan fremje utvikling av både  $T_H1$  og  $T_H2$  immunrespons. Dendrittiske celler kan indusere  $T_H2$  immunrespons uavhengig av IL-4 ved OX40 signalering eller ved hjelp av Notch liganda JAGGED-1 og JAGGED-2 som bind til Notch reseptor på  $CD4^+$  celler (Amsen et al. 2004; Ohshima et al. 1998). OX40 er ein reseptor som vert uttrykt på T-celler etter aktivering. OX40 bind til OX40 ligand som er uttrykt på APC. Det er og påvist andre mekanismar for korleis dendrittiske celler kan påverke ein immunrespons i retning av  $T_H2$ . Blant anna kan

blokkering av INF- $\gamma$  produksjon hjå dendrittiske celler føre til at dei kan fungere som APC i  $T_H2$  immunitet. INF- $\gamma$  fremjar utvikling av  $T_H1$  celler ved at den bind seg til reseptor på overflaten av T-celler og induserer oppregulering av transkripsjonsfaktoren T-bet (Perrigou et al. 2009). Om det er basofile granulocytter eller dendrittiske celler, eller begge som fungerer som APC for  $CD4^+$  T-celler i induksjon av  $T_H2$  immunrespons ser ut til å vere avhengig av antigenet, eksponeringsveg og om andre T-celle responsar må verte regulert samtidig. Nyleg vart det publisert ein oversiktsartikkel som seier at basofile granulocytter ser ut til å vere viktige i induksjon av  $T_H2$  respons mot proteaseallergen, i tillegg til helmintinfeksjonar. Dendrittiske celler er viktige i induksjon av  $T_H2$  respons mot lipidbindande allergen, som Der p2 frå husstøvmidd og ved nokre helmint infeksjonar (figur 5) (Paul & Zhu 2010). For eksempel ved *Nocardia brasiliensis* infeksjon i mus er ikkje basofile granulocytter nødvendige for utviklinga av  $T_H2$  immunrespons (Kim et al.2008).



**Figur 5:** Både basofile granulocytter og dendrittiske celler kan fungere som APC og produsere cytokin som kan indusere allergen, eller parasittmediert  $T_H2$  respons, avhengig av type allergen og kva eksponeringsrute som allergenet har nytta. Cysteinproteasener synast å fremje aktivering av basofile granulocytter, som i sin tur fungerer både som IL-4 kjelde og APC for  $CD4^+$  T-celler. Produkt skilt ut frå helminten *T.muris*, kan indusere modning av både basofile granulocytter og dendrittiske celler som i sin tur begge fremjar utvikling av  $T_H2$ - immunrespons (Paul & Zhu 2010).

### **1.2.4 TSLP kan indusere produksjon av ein annan populasjon av basofile granulocytter**

TSLP er eit IL-7 liknande cytokin som er produsert av epitelceller ved barriereoverflater og av basofile. Det er vist at cysteinproteasen papain og serinproteasen trypsin kan indusere epitelceller i luftvegane til å produsere å skilje ut TSLP, gjennom aktivering av proteaseaktivert reseptor 2 (PAR2) (Kouzaki et al. 2009). I tillegg er det påvist TSLP produksjon av basofile etter at dei er aktivert (Sokol et al. 2008). Høg produksjon av TSLP er assosiert med atopisk eksem, astma og matvareallergi (Al-Shami et al. 2005; Blázquez et al. 2010; Ying et al. 2005). I eit nyare studie er TSLP antyda å spele ei rolle i utvikling og modning av basofile granulocytter. IL-3 og TSLP indusert produksjon av basofile, fører henholdsvis til at det vert danna to ulike basofile granulocyttopulasjonar som har ulikt uttrykk av overflatemarkørar, ulikt mønster av genuttrykk og som responderer forskjellig på stimulering med IL-3, og IL-33 eller IL-18 (Siracusa et al. 2011). Dette kan forklare kvifor ein person som har ein allergisk sjukdom ofte utviklar fleire allergiske sjukdommar. For eksempel kan ein person som har utvikla allergi mot matvarer seinare utvikle symptom på høysnue eller astma.

### **1.2.5 Aktiveringsmarkørar for basofile granulocytter**

Basofile granulocytter uttrykkjer etter aktivering fleire membranmarkørar. Blant anna CD63, som er eit membranprotein som tilhøyrar transmembran 4 superfamilien. CD63 er lokalisert både på membranoverflaten og i granula membran. Allergen mediert kryssbinding av FcεRI førar til at basofile granulocytter degranulerer, noko som førar til at granulamembranen smeltar saman med plasmamembranen. På denne måten vert det eit auka uttrykk av CD63 på membranoverflaten av cellene (Knol et al. 1991; MacGlashan 2010). Ein annan aktiveringsmarkør er ektonukleotid pyrofosfatase/fosfodiesterase-3 (CD203c) og uttrykket av denne er unik for basofile granulocytter og mastceller (Buhring et al. 1999; Buhring 2001). CD203c er lokalisert på membranoverflaten og i intracellulære vesiklar. Ved allergenmediert kryssbinding av FcεRI vert intracellulært CD203c raskt mobilisert til membranoverflaten (Buhring et al. 2004). Væskestrøm cytometrisk basofilaktiveringstest (BAT) er utvikla for *in vitro* diagnose av IgE-medierte reaksjonar. Ved basofilaktiveringstest vert blod frå pasientar stimulert med allergene forbindelsar og deretter farga med fluorokrom-konjugert antistoff

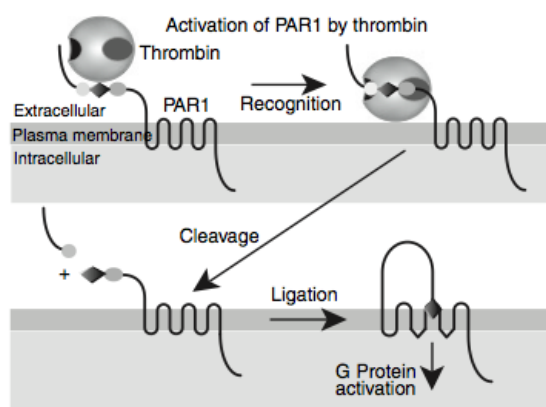
retta mot aktiveringsmarkøren (Eberlein et al. 2010). Fluorescensen vert påvist ved væskestrømscytometri .

### 1.3 Proteaseaktiverte reseptorar (PAR)

Proteaseaktiverte reseptorar (PAR) er ein type G-proteinkopla reseptorar. Dei består av 7 transmembrane heliksar, eit N-terminalt ekstracellulært domene og eit C-terminalt cytoplasmisk domene (Vu et al. 1991). PAR koplar til heterotrimere G-protein. Heterotrimere G-protein består av tre subeiningar:  $\alpha\beta\gamma$ . Når reseptoren er aktivert av ein ligand, fungerer den som ein guanin-utveksling faktor for G-proteinet. Det gjer at  $\alpha$ -subeininga i G-proteinet utvekslar GDP med GTP, noko som fører til ein konformasjonsendring i G-proteinet og aktiverer det. Det er beskrevet fire PAR reseptorar; PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4. Desse reseptorane er medverkande i hemostase, trombose og inflammasjonsreaksjonar.

#### 1.3.1 Aktivering av PAR

Aktivering av PAR skjer ved at reseptoren vert kjent att av ei protease som kløyver det ekstracellulære N-terminale domenet ved spesifikke sete. Dette fører til at ein ny N-terminal del vert eksponert og denne fungerer som ein ligand som bind intramolekylært til ein del av reseptoren (Figur 6) (Chen et al. 1994; Vu et al. 1991). Den aktiverte PAR reseptoren bind til og aktiverer eit G-protein, noko som fører til igangsetjing av ei signaloverføringskaskade.



**Figur 6: Proteaseaktiverte reseptorar består av eit N-terminalt domene, eit 7-heliks transmembrandomene og eit intracellulært C-terminalt domene. Trombin kløyver PAR1 på eit spesielt område i det N-terminale domenet, noko som fører til at ein ny N-terminal ende vert eksponert. Denne fungerer som ein ligand som bind til og aktiverer reseptoren (Coughlin 2005).**

Trombin, ei serinprotease i koaguleringskaskaden i blod aktiverer PAR1, PAR3 og PAR4 (Vu et al. 1991; Ishihara et al. 1997). PAR2 skil seg frå dei andre PAR reseptorane i at den ikkje vert aktivert av trombin. Trypsin aktiverer PAR2, det er og vist at trypsin kan aktivere PAR1 og PAR4 (Nystedt et al. 1994; Vu et al. 1991). Syntetiske peptid som etterliknar dei fyrste aminosyrene i den nydanna N-terminale ende kan aktivere PAR uavhengig av proteaser og proteolytisk kløyving (Lerner et al. 1996), med unntak av PAR3 som ikkje responderer mot syntetisk peptid (Nakanishi-Matsui et al. 2000).

### 1.3.2 Andre proteaser som kan aktivere PAR

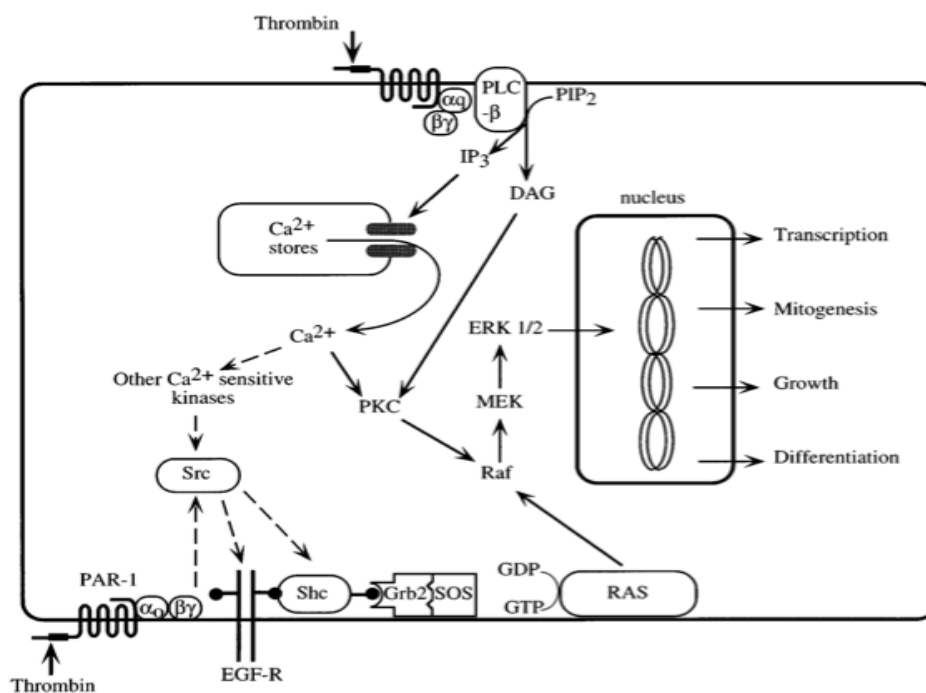
Plasmin er vist å kunne aktivere PAR1 (Pendurthi 2002) i fibroblaster og PAR4 i blodplater (Quinton et al. 2004). I område med inflammasjon kan tryptase frå mastceller aktivere PAR2 (Akers et al. 2000; Molino et al. 1997). Cathepsin G, elatase og protein-3 frå nøytrofile kan og aktivere PAR2. Cathepsin G kan aktivere PAR4 på blodpater. Denne serinproteasen er lagra i granuler hjå nøytrofile og er frigjeve ved stimulering av blodplate aktiverande faktor (Sambrano et al. 2000).

Proteaser frå allergenproduserande organismar kan og aktivere PAR. Serinproteasene Der p3 og Der p9 frå husstøvmidd er vist å aktivere PAR2 i ei luftvegsepitelcelleline. Stimulering med Der p3 og Der p9 gir hydrolyse av fosfatidylinositol 4,5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) og mobilisering av cytosolisk Ca<sup>2+</sup>. Responsen følgjer eit likt mønster som ved aktivering med trypsin og PAR2 agonist (Sun et al. 2001).

### 1.3.3 Signalering gjennom PAR

Mekanismane for signalering gjennom PAR1 og PAR2 er grundig studert, og det er signaleringen gjennom PAR1 som er best kartlagt. Aktivert PAR1 kan kople til heterotrimeriske G-protein av undertypane G<sub>12/13</sub> (Offermanns et al. 1994), G<sub>q</sub> og G<sub>i</sub> (Hung et al. 1992). Studie på ulike celletypar viser at aktivert PAR2 fører til danning av inositol 1,4,5-trefosfat (IP<sub>3</sub>) og auking i intracellulært kalsium (Ca<sup>2+</sup>). Difor koplar PAR2 truleg til G<sub>q</sub> (Böhm et al. 1996; Kong et al. 1997; Nystedt et al. 1995). PAR3 manglar den cytoplasmiske halen som koplar reseptoren til G-protein, difor er moglegheita PAR3 har til å danne intracellulære signal usikker. Funksjonen til PAR4 er ikkje like godt kartlagt som for PAR1 og PAR2. Studie på fibroblaster har vist at PAR4 koplar til G<sub>q</sub> og G<sub>12/13</sub> (Faruqi et al. 2000).

PAR er vist å kunne aktivere ekstracellulær regulert kinase (Erk) i tarmepitelceller (Fyfe et al. 2005; Wang et al. 2010), eosinofiler (Temkin et al. 2002), luftvegsepitelceller (Page et al. 2003) og i fibroblaster (Sabri 2002). Erk inngår i mitogenaktivert proteinkinase (MAP kinase) signalvegen. MAP kinase signalvegen består av 3 moduler av kinaser som fosforylerer kvarandre og regulerer cellulære funksjonar som differensiering, metabolisme, mitose og apoptose. MAPK kinase kinase (Raf) aktiverer MAPK kinase (Mek) som i sin tur aktiverer MAP kinase (Erk 1 og 2). Aktivert Erk entrar cellekjernen, der den aktiverer fleire transkripsjonsfaktorar. Hovudmekanismen bak aktivering av Erk er truleg gjennom PAR kopling til  $G_q$ .  $G_q$  aktiverer fosfolipase  $C\beta$ , som i sin tur spaltar  $PIP_2$  til inositol trifosfat ( $IP_3$ ) og diacylglycerol (DAG).  $IP_3$  bind til kalsiumkanalar i endoplasmisk retikulum (Er), noko som fører til auka nivå av  $Ca^{2+}$  i cytosol.  $Ca^{2+}$  og diacylglycerol aktiverer saman proteinkinase C (PKC). I fibroblaster er det vist at  $G_q$  kan kople PAR1 til MAP kinase signalvegen via mediatorane PKC og proto-onkogen tyrosinkinase (src) (Sabri 2002) (Figur 7).



**Figur 7:** Aktivering av MAP-kinase signalvegen gjennom PAR1. PAR1 kopling til  $G_q$  fører til aktivering av fosfolipase- $\beta$  som i sin tur kløyver  $PIP_2$  til  $IP_3$  og DAG.  $IP_3$  bind til kalsium ionekanalar i ER og induserer auka konsentrasjon av  $Ca^{2+}$  i cytosol.  $Ca^{2+}$  og DAG aktiverer i sin tur PKC, i tillegg kan Src verte aktivert av  $Ca^{2+}$ . Src kan transaktivere RTK. I tillegg kan PKC direkte aktivere Raf som i sin tur aktiverer MEK (Déry et al. 1998).

### 1.3.4 PAR og allergi

PAR er funne i fleire av kroppens immunceller. PAR er blant anna funne uttrykt i monocytter, makrofagar, mastceller, nøytrofile og eosinofile granulocytter (Colognato et al. 2003;

D'Andrea et al. 2000; Howells et al. 1997; Miike et al. 2001). I KU812, som er ei human celleline med basofile eigenskapar er det påvist mRNA for PAR1, PAR3 og PAR 4 (Yamaguchi et al. 2008). Aktivering av PAR2 er vist å indusere syntese og utskiljing av prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>) i enterocytter (Kong et al. 1997). PGE<sub>2</sub> er eit lipidmolekyl som blant anna er ein viktig mediator i utviklinga av betennelse, feber og allergi (Dewick 2009). PAR2 kan og aktivere nukleær faktor kappaB (NFκB), dette er ein transkripsjonsfaktor som er involvert i betennelsesresponsar og som er sentral i medfødde immunresponsar (Shapovitch et al. 2002).

Fleire studie har vist at aktivering av PAR2 kan knytast til utvikling av allergi i luftvegane (Ebeling et al. 2007; Schmidlin et al. 2002; Shpacovitch et al. 2004).

Ved forsøk med mus er det er blant anna vist at aktivering av PAR2 i luftvegane samtidig som celler stimulerast med eit antigen fører til utvikling av allergi. Dersom cellene stimulerast med antigenet åleine vil toleranse verte utvikla (Ebeling et al. 2007). Aktivering av PAR2 på nøytrofile aukar deira migrasjon gjennom ekstracellulær matriks mot staden med inflammasjon, i tillegg aukar det utskiljing av cytokin og uttrykk av adhesjonsmolekyl (Shpacovitch et al. 2004). Aktivering av PAR4 på leukocytter i rotter er vist å stimulere til rulling og adhesjon av leukocytter til endotelcelleveggen i blodkar (Vergnolle et al. 2002).

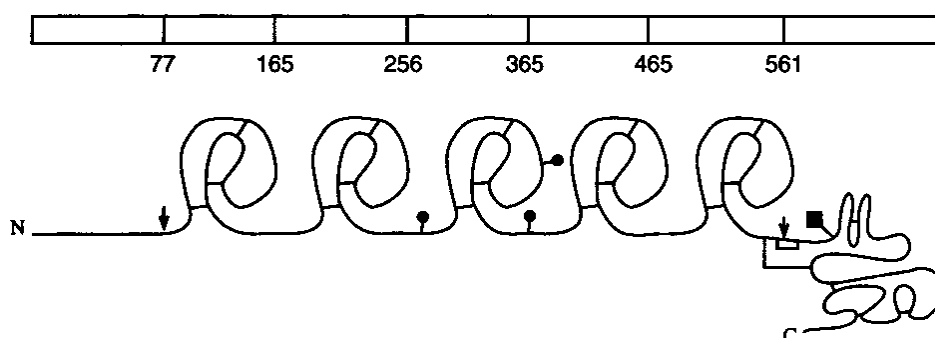
## **1.4 Serinproteaser i mjølk**

Mjølk inneheld mange ulike proteaser, mest kjent er plasminsystemet, lysosomale proteaser og i tillegg proteaser produsert av psykrotrofe.

### **1.4.1 Plasminsystemet**

Plasminsystemet er best studert av proteaser i mjølk, dette består av plasmin, den sitt inaktive zymogen plasminogen, plasminogenaktivatorar (PA), plasmin inhibitor (PI) og plasminogen aktivator inhibitor (PAI). Den fysiologiske rollen til plasmin i blod er blant anna nedbryting av blodproppar (fibrinolyse) i tillegg til proteolyse av andre protein i forskjellige andre system. Plasminsystemet er og funne i blodet hjå menneske. Plasmin entrar mjølka i form av plasminogen via epitellaget i brystkjertelen (Nielsen et al. 2002). I mjølka assosierer plasminogen med kaseinmiceller (Politits et al. 1992), som er ei samling av ulike typar

kaseinprotein saman med kalsiumfosfat. Dei hydrofobe kaseinproteina er pakka inn i kjernen av micellen, med kappakasein som er hydrofil på overflaten (Nielsen et al. 2002). Plasmin og plasminogenaktivatorar assosierer og med kaseinmiceller, så det er hovudsakeleg her aktiveringa av plasminogen skjer (Korycka-Dahl et al. 1983 ; Politis et al. 1992). I fersk mjølk er konsentrasjonen av plasminogen 2-30 gonger høgare enn plasmin (Bastian & Brown 1996). Bovint plasminogen består av eitt preaktiveringspeptid, fem kringle domene og eitt protease domene (Figur 8). Ved aktivering av plasminogen vert fyrst preaktiveringspeptidet kløyvd av, dette fører til ei konformasjonsendring i plasminogen som gjer det lettare tilgjengeleg for PA. PA aktiverer plasminogen ved å kløyve ei binding mellom kringle 5 og proteasedomenet, dette dannar plasmin som består av ei lett kjede (proteasedomenet) og ei tung kjede (kringledomena) som er assosiert via disulfid bindingar (Shaller et al. 1985).



**Figur 8:** Figuren viser skjematisk strukturen til plasminogen. Pil indikerer kløyvingssete, kuler indikerer glykolyseringssete og firkant indikerer fosforyleringssete. Små mengder plasmin som er tilstade i mjølka kløyver av det N-terminale preaktiveringspeptidet. Plasminogen vert dermed lettare tilgjengeleg for plasminogen aktivatorar som kløyver plasminogen i tungkjede A og lettkjede B. Desse to assosierer og dannar funksjonelt aktivt plasmin (Schaller et al. 1985).

Som beskrive i ein oversiktsartikkel er det to ulike typar PA, urokinasetype og vevs-PA. Urokinasetype er forbunde med somatiske celler, medan vevstypen er assosiert med kasein miceller (Nielsen et al. 2002). Plasmin kløyver protein på karboksylsida av L-arg og L-lys, med ei preferanse for L-lys. I mjølk kløyver plasmin  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - og  $\beta$ -kasein.  $\beta$ -kasein er brote ned til  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  kasein og proteose pepton kasein (Nielsen et al. 2002). Plasmin har lite eller ingen aktivitet mot myseproteina  $\alpha$ -laktalbumin og  $\beta$ -laktoglobulin.



Det har vore utført mange studie for å undersøkje korleis prosessering av mjølk påverkar aktiviteten til plasmin. Desse studia har vist at plasmin, plasminogen og plasminogen aktivatorar er svært varmelabile (Nielsen 2002). Plasmin inhibitor (PI) og plasminogen aktivator inhibitor (PAI) er varmelabile, og kan difor ikkje kontrollere aktiveringa av plasmin etter at mjølka er pasteurisert. I følgje Prado et. al har PAI og PI ulik termal stabilitet, deira studie viste at om lag 80% av PAI vart inaktivert under pasteuriseringsprosessen, medan berre 36% av PI vart inaktivert. Dette kan forklare kvifor ein finn ei auking i aktivering av plasminogen men at denne aktiveringa ikkje gir tilsvarande auking i aktivt plasmin. Sidan PAI er inaktivert, kan aktiveringa av plasminogen overkome hemminga av plasmin (Prado et al. 2006). Dette gjer at verken pasteurisering av mjølk, eller ultrahøg temperaturbehandling av mjølka inaktiverer plasmin i nokon stor grad.

#### **1.4.2 Lysosomale proteaser**

I ein oversiktsartikkel av Kelly et al. er det beskrive at lysosoma i somatiske celler i mjølk er ei viktig kjelde for proteolytiske enzym, som og er funne i løyseleg form i mjølk. Cathepsin D er eit lysosomalt enzym som er presentert i den sure mysefraksjonen av mjølka.

Cathepsin D hydrolyserar  $\alpha_{s1}$ -kasein,  $\beta$ -kasein og glukomakropeptid frå  $\kappa$ -kasein.

Lysosom frå somatiske celler inneheld og eit antall av serinproteinaser ( t.d. elastase og cathepsin C og G) og cysteinproteinaser (cathepsin B). Lysosomale proteinaser er kontrollert av eit komplekst system. Desse systema kan og interagere med andre system som til dømes Cathepsin B og L kan aktivere zymogen av urokinasetype PA, cystein proteinase kan aktivere procathepsin D og cathepsin D kan aktivere zymogen av cystein proteinase. Proteolyse i mjølk med lågt antall av somatiske celler er dominert av plasmin, men når somatiske celle antallet i mjølka stig vert bidraget frå plasmin mindre, medan aktiviteten til andre enzym aukar (Kelly et al. 2006).

#### **1.4.3 Proteaser produsert av psykrotrofe bakteriar**

Psykrotrofe bakteriar er bakteriar som veks optimalt ved ein temperatur på 15 grader celsius eller lågare. Dei kan overleve ved temperaturar ned mot 0 grader celsius (Madigan et al. 2009). I fersk mjølk lagra i kjøleskap er bakterieveksten dominert av *Pseudomonas fluorescens*. Ekstracellulære proteaser produsert av denne bakteriestammen fører til eit skift i

plasmin og plasminogen aktiviteten frå kaseinfraksjonen til mysefraksjonen. Det er trudd at desse proteasene bryt ned kappa-kasein som er lokalisert på overflaten av kaseinmicellene og at det fører til at kaseinmicellen bryt opp og at plasmin, plasminogen og plasminogen aktivatorar dermed vert frigjeve til mysefraksjonen av mjølka. Dette kan påverke kvaliteten på nokre meieriprodukt, i tillegg kan det ha negativ effekt på produkt som nyttar myseprotein som ein funksjonell ingrediens (Fajardo-Lira et al. 2000).

## 1.5 Mål med oppgåva

Basofile har i dei seinare åra vist seg å spele ei rolle i utvikling av allergi, primært luftvegsallergi. Det er vist at luftvegsallergen med proteaseaktivitet kan aktivere basofile granulocytter slik at dei kan indusere  $T_H2$ -mediert immunrespons. Målet med denne oppgåva var å undersøkje om proteaser i næringsmidlar kan påverke utvikling av matvareallergi gjennom deira effekt på basofile granulocytter. Mjølke inneheld fleire serinproteaser der plasmin er best studert. I denne oppgåva vart bovint plasmin nytta for å studere den sin effekt på basofile granulocytter.

## 2 Materiale

### 2.1 Utstyr og instrument

<b>Teknikk</b>	<b>Utstyr/instrument</b>	<b>Produsent</b>
Sentrifuger	Biofuge pico Digicenzo-R Megafuge 1.0	Heraeus OrtoAlresa Heraeus
Mikroskop	Leica DFC420	Leica
Celledyrking	Automatpipette 24 brønners cellekulturplate 6 brønners cellekulturplate 250 mL cellekulturflaske Falcon 25 mL cellekulturflaske Falcon Coulter Z1 (Partikkelteljar) PP-testrøyr 15 mL PP-testrøyr 50 mL Steril-cycle CO2 inkubator Sterilbenk	IBS Integra Biosciences BectonDickinson Labware BectonDickinson Labware BectonDickinson Labware BectonDickinson Labware Coulter Electronics ltd. Greiner bio-one Greiner bio-one Thermo scientific Biowizard
Cellestimulering	Tempette Junior Varneblokk	Techne Stuart
SDS-PAGE	Mini PROTEAN 3 Power Pac 300	BioRad BioRad
Westernblot	Semi-Dry Amersham Hybond Whatman Kromatografipapir	Hoefer GE Healthcare Whatman International Ltd.
Deteksjon av CD63	96 brønnersplate Macsquant analyser (Flowcytometer)	Nunc Miltneyi Biotek
RT-PCR	Nanodrop ND_1000 spektrometer PTC 200 Peltier Thermal cyclers Rotor-Gene™ 600	Thermo Scientific MJ research Corbett research
Isolering av basofile granulocytter	Dynal™ MPC®-6 Dynal™ MPC® -E	Dynal AS Dynal AS

## 2.2 Kjemikalie

Kjemikalie	Produsent
2β-Merkaptetanol	SIGMA
Akrylamid	SIGMA
Aktiverande peptid for PAR1 (AP1)	Genscript
Aktiverande peptid for PAR2 (AP2)	Genscript
Aktiverande peptid for PAR4 (AP4)	Genscript
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Bovint plasmin	Roche Diagnostic GmbH
Bovint trypsin	SIGMA
Bromfenolblått	Merck
Dimetyl sulfoksid (DMSO)	Merck
Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA)	SIGMA
Fikseringsvæske	AGFA
Framkallingsvæske	AGFA
Glyserol 87%	MERCK
Glysin	SIGMA
4-(2-hydroksyetyl)- 1-piperazinetansvovelsyre (HEPES)	SIGMA
Hydrogenklorid (HCl)	
Luminata Classico™ western HRP substrat	Millipore Corporation
Luminata Crescendo™ western HRP substrat	Millipore Corporation
Metanol	Technical
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SIGMA
Natriumfluorid (NaF)	PAA Laboratories GmbH
Natriumklorid (NaCl)	MERCK
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	SIGMA
N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin (FMLP)	SIGMA
Nonyl fenoksyypolyetoksyletanol (NP-40)	USB
Percoll	SIGMA
Pierce ECL western blotting substrat	SIGMA
Protein standard: Precision plus protein, Dual Color	BioRad
Skumma tørrmjølk	Normilk AS
Tetrametyletyldiamin (TEMED)	BioRad
Trizmabase	SIGMA

## 2.3 Medie og løysningar

Medie og løysningar	Produsent
Føtalt kalveserum (FKS)	PAA Laboratories Gmbh
Gentamycin	BIOWhittaker
HBSS	Invitrogen
Ikkje-essensielle aminosyrer	PAA Laboratories Gmbh
Monothiolglycerol	SIGMA
Natriumpyruvat	PAA Laboratories Gmbh
Dulbecco PBS	PAA Laboratories Gmbh
RPMI 1640 med L-glutamin	PAA Laboratories Gmbh

## 2.4 Antistoff og partiklar kopla til antistoff

Antistoff	Produsent
Esel anti-mus IgG Alexa Fluor® 647 konjugert	Jackson Immuno Research
Anti-fosfo p44/42 MAPK (Erk 1/2)	Cell signaling
Anti-CD63 Fluorescein isothiocyanat (FITC)-konjugert	BD Biosciencer
Mus anti-humant CD3 FITC-konjugert	Diatec monoclonals
Mus anti-humant CD19 FITC-konjugert	Diatec monoclonals
Geit anti-mus IgG HRP konjugert	Southern biotechnology
Geit anti-kanin IgG	Southern biotechnology
Kanin anti-aktin	SIGMA
Mus anti-humant FcεRI	Mitney Biotechnology
Mus anti-humant CD3/CD28 kopla partiklar (Dynabeads)	Dynal
Sau anti-muse IgG kopla partiklar (Dynabeads)	Dynal

## 2.5 Primere

Primere	Produsent
PAR1 (Forward og reverse)	Eurogentec
PAR2 (Forward og reverse)	Eurogentec
PAR3 (Forward og reverse)	Eurogentec
PAR4 (Forward og reverse)	Eurogentec

## 2.6 Kit

Kit	Produsent
Power Cybr®GREEN	Invitrogen
RNeasy® Microkit (50)	Qiagen
RNeasy® Minikit (50)	Qiagen
Superscript®VILO™ cDNA syntese kit	Invitrogen

## 2.7 Oppskrifter

### 2.7.1 Arbeid med celler

#### RPMI-1640 med 10% føtalt kalveserum

500 mL RPMI-1640

5 mL av ei 100 mM løysning av Natriumpyruvat

5 mL av ei 100x løysning av ikkje essensielle aminosyrer

250 µl gentamycinsulfat

25 µl av ei 1M løysning, monothioglycerol

50 mL inaktivert føtalt kalveserum (FKS)

#### Frysemedium ( 50 mL )

35 mL RPMI frå ferdigblanda RPMI medium

5 mL inaktivert føtalt kalveserum (FKS)

10 mL DMSO

### 2.7.2 Stimulering av celler

#### Stokkløysningar

10 mg trypsin frå bovin bukspyttkjertel frå sigma vart løyst i 10 mL steril PBS

1.59 µl aktiverande peptid for PAR1 (1.59 µl), PAR2 (1.64 µl) og PAR4 (1,56) µl aktiverande peptid for PAR2 vart løyst i 1 mL steril PBS

100 µl plasmin vart løyst i 900 µl steril PBS

### 2.7.3 SDS-PAGE og western blotting

#### 1.5M TrisHCl, pH 8.8

181.6 g Tris

Destillert vatn til 1000 mL og HCl til pH 8.8

#### 0.5 M TrisHCl, pH 6.8

30.3 g Tris

Destillert vatn til 500 mL og HCl til pH 6.8

**10% SDS løysning**

10.0 g SDS

Destillert vatn til 100 mL

**10% APS**

1.0 g APS

Destillert vatn til 10 mL

*Løysninga vart fordelt i røyr på 1 mL og oppbevart ved -20 °C*

**Prøvebuffer**

25 mL 0.5 M TrisHCl, pH 6.8

40 mL 10% SDS

20 mL Glyserol

0.2 mg Bromfenolblå

15 mL Destillert vatn

*Bruksløysning:*

9 mL 2x samplebuffer

1 mL 2 mercaptoetanol

**10x Elektroforesebuffer**

30.0 g Tris

144.0 g Glycin

10.0 g SDS

Destillert vatn til 1000 mL

**10x Proteinoverføringsbuffer**

30.0 g Trizma base

144.0 g Glysin

Destillert vatn til 1000 mL

*Bruksløysning (1L):*

100 mL 10x Transferbuffer

100 mL metanol

800 mL Destillert vatn

**10x TBS, pH 7.4**

31.5 g Tris

90.0 g NaCl

Destillert vatn til 1000 mL og HCl til pH 7.4

*Bruksløysning:*

100 mL 10x TBS

900 mL Destillert vatn

1 mL Tween 20

**4% konsentrerende gel****10% separerende gel**

Per gel:

2 gelar:

1.7 mL Akrylamid

0.67 mL Akrylamid

1.25 mL 1.5 M TrisHCl

1.25 mL 0.5 M TrisHCl

0.05 mL 10 % SDS

0.05 mL 10% SDS

2.0 mL Destillert vatn

3.0 mL Destillert vatn

25 µl APS

2.5 µl TEMED

1.7 µl TEMED

50 µl APS

**Blokkeringsbuffer med 5% tørrmjølk**

5 g Feittfri tørrmjølk

100 mL TBS med 0.1% Tween

**1x lyseringsbuffer**

0.242 g Tris HCl pH 7.4

1.75 g NaCl

0.058 g EDTA

2 mL NP-40

Destillert vatn til 200 mL



**Natriumflorid (0.2 M)**

0.42 g NaF

Destillert vatn til 50 mL

**Natriumortovanadat**0.184 g Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

Destillert vatn til 10 mL

**Bruksl sning lyseringsbuffer**

7.4 mL 1x lyseringsbuffer

2.5 mL NaF

0.1 mL Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

1:100 100x proteasehemmare

100x proteasehemmare inneheldt leupeptin (1mg/mL), antipeptin (1mg/mL), pepstain A (1mg/mL) og chymostatin (1mg/mL).

**2.7.4 Isolering av basofile celler****Percoll stockl sning ( 10 gradientar)**

90 mL Percoll

9 mL 10XHBSS (utan Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> og fenol r d)

1 mL 0.25 M HEPES buffer, pH 7.3

0.4 mL 1M HCl

**Percoll tettleiks l sningar for 10 gradientar**

<u>Tettleik (g/mL)</u>	<u>Percoll løsning/1XHBSS (mL/mL)</u>
1.070	24.0:20.0
1.079	27.0:15.9
1.088	23.0:10.0

## 3 Metodar

I oppgåva vart det utført forsøk med cellelinen KU812. Denne cellelina er etablert frå perifert blod til ein pasient med kronisk myelogen leukemi. Cellelina har nokre karakteristikkar til basofile leukocytter, dei inneheld FcεRI-reseptorar, granuler, produserer histamin og er negative for lymfocytt markørar.

### 3.1 Celloarbeid

**Materiale:** Automatpipette, cellekulturflasker, celleteljar, fryseampullar, frysemedie, KU812 celleline, mikroskop, RPMI med 10% kalveserum, sentrifuge, sentrifugerøyr, sterilbenk, teljebuffer.

**Prosedyrar:**

#### 3.1.1 Celledyrking

Cellene vart dyrka i 75 cm<sup>2</sup> cellekulturflasker med 20 mL medium i inkubatorskap ved 37 °C og 5% CO<sub>2</sub>. Cellene vart sådd ut i ein konsentrasjon på 300-500 000 per mL. Cellene vart splitta når mediet byrja å verte gromsete. Cellesuspensjonen vart overført til sentrifugerøyr og cellene vart spunne ned ved 1300 rpm i 10 minutt. Det gamle mediet vart fjerna og cellepelletten vart resuspendert i 1 mL medium. 20 µl av cellesuspensjonen vart tilsett 10 ml 0,9% saltløysning (NaCl). Teljaren vart innstilt på å rekne celler mellom 4 og 12 µm, antallet vart oppgitt som 1000 per ml.

#### 3.1.2 Innfrysing av celler

Cellene vart sentrifugert ned ved 1300 rpm i 10 minutt. Cellene vart resuspendert i medium og plassert på is. Same volum av frysemedium vart tilsett forsiktig. Per ampulle vart det overført 3-5 millionar celler i eit totalvolum på 1 mL. Cellene vart fryst ned i minus 80 °C over natt. Dagen etter vart ampullane overført til nitrogentank.

### 3.1.3 Tining av celler

Ampullen med dei nedfryste cellene vart satt i varmebad (37°C) til det var att ein liten isklump. Iskaldt medium vart overført til eit sentrifugerøyr, deretter vart celleløysninga helt over. Cellene vart sentrifugert ned ved 1300 rpm i 10 min, resuspendert i medium og sentrifugert på nytt. Cellene vart talt og sådd ut i ei 24-brønnersplate.

## 3.2 Real time polymerase kjedereaksjon (qPCR)

**Materiale:** Nanodrop, primere for PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4 og GAPDH, RNeasy Mini Kit (Qiagen), PTC200 Peltier Thermal Cycler, Rotor gene 6000, Superscript®VILO™ cDNA syntese reagenser, Express SYBR® GreenER™ qPCR supermiks (Intvitrogen).

**Prosedyre:** I Real time PCR er mengda av mRNA kvantitert etter kvar syklus ved at det vert nytta fluorescerande fargestoff som vert inkorporert i PCR produktet. Auking i fluorescensen er proporsjonal med mengde PCR produkt som er produsert i den eksponentielle fasen av reaksjonen. PCR maskina er kopla til både ein termosyklar og ein skanner. På den måten kan den detektere fluorescens samtidig som den utører temperatur endringar som er nødvendig for PCR syklusane. Ettersom det vert produsert meir DNA vil og fluorescensen i prøvene auke. Eit dataprogram som er kopla til termosyklaren vil plote fluorescens intensitet (y-akse) mot antall PCR syklusar (x-akse). I denne oppgåva vart SYBRGreen som bind til ”minor groove” i dobbeltråda DNA brukt for kvantitering av mRNA.

Det vart isolert RNA frå KU812 ved å nytte RNeasy mini kit og frå isolerte basofile isolert frå fullblod ved å nytte RNeasy micro kit. Mengde mRNA som vart isolert var målt med nanodrop. cDNA syntese vart utført ved å nytte Superscript®VILO™ cDNA syntesereagenser etter prosedyren som er beskrive i manualen som følgde med kitet. I cDNA syntesen vart det nytta 155 ng mRNA frå KU812 cellene og maksimal mengde mRNA frå isolerte basofile granuloyttar.

For kvart oppsett til qPCR vart det nytta spesifikke primere for ein av PAR reseptorane (tabell 1) og hushaldningsgenet 3-fosfo glyseraldehyd dehydrogenase (GAPDH). Per reaksjon vart det nytta SYBR Green mastermiks (5µl), spesifikke primere (0,4 µl forward primer og 0.4 µl reverse primer), templat (2 µl) og DEPC behandla vatn opp til 20 µl. Som positiv kontroll vart cDNA frå tjukktarmceller nytta.

Det vart utført tostegs qPCR med følgjande innstillingar; 50°C i 2 minutt, 95°C i 2 minutt, deretter 40 syklusar av stega; 1: 95°C i 15 sekund og 2: 60°C i 1 minutt. Når programmet var ferdig vart det manuelt satt ein syklusgrenseverdi i det lineære området på standardkurven. Programmet ga så kvar prøve ein syklusgrenseverdi (Ct). Syklusgrenseverdien angir antallet PCR-syklusar til ei prøve når den når den fastsette grenseverdien. Ct verdiane kan nyttast til å rekne ut endringa i syklusgrenseverdi ( $\Delta Ct$ ) for kvar prøve. Denne verdien vert rekna ut ved at Ct verdien til referansegnet vert trekt frå Ct verdien til prøvene.

**Tabell 1: Oversikt over forward og reverse primere nytta for kvar av PAR reseptorane.**

	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
<b>PAR1</b>	5'-CTGATCATTTCACGGTCTG	5'-ATGCTGCTGACACAGACACA
<b>PAR2</b>	5'-TCCTGCAGTGGCACCATCCA	5'-TTGCCTTCTTCCTGGAGTGC
<b>PAR3</b>	5'-TACCCTCCACCACTTCACAA	5'-GAGGTTTGGTTGGTGCCTAT
<b>PAR4</b>	5'-TTACATCCAGTGTGGGTGGT	5'-TCCTTCTGCCTCAGTCTCCT

### 3.2 Stimulering av celler

**Materiale:** Aktiverande peptid for PAR1, PAR2 og PAR4, ependorfrøyr, KU812 celler, plattform, bovint plasmin, sentrifuge, bovint trypsin, varmebad.

**Prosedyre:** Cellene vart splitta og spunne ned ved 1300 rpm i 10 minutt. Cellene vart overført til ependorfrøyr med ein konsentrasjon på 1 million celler per røyr. Stimuleringa føregjekk i varmebad (37 °C) inne på sterilrom og den stimulerande forbindelsen vart tilsett etter ulike tidsinterval. Konsentrasjon og type stimulerande forbindelse er vist i tabell 2. Konsentrasjon i doserespons forsøk er oppgitt i resultatdel.

**Tabell 2:** Tabellen viser ei oversikt over konsentrasjon og tid for stimulering med AP-PAR1, AP-PAR2, AP-PAR4, plasmin og trypsin.

Stimulert med	Konsentrasjon	Stimuleringstid (min)
Pervanadat + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.1 µM	5
AP-PAR-1	100 nM	5, 10, 15, 20, 30, 60
AP-PAR-2	100 nM	5, 10, 15, 20, 30, 60
AP-PAR-4	100 nM	5, 10, 15, 20, 30, 60
Trypsin	15 nM	5, 2, 10, 15, 30, 60
Plasmin	200 nM	5, 10, 15, 20, 30, 60
fMLP ( analyse av CD63)	2 µM	15, 30, 45, 60
Trypsin (analyse av CD63)	15 nM	10, 15, 20, 25, 30, 45, 60
Plasmin (analyse av CD63)	200 nM	10, 15, 20, 25, 30, 45, 60

### 3.3 Lysering av celler

**Materiale:** Kjølesentrifuge, lyseringsbuffer (bruksløsning), prøvebuffer, varmeblokk.

#### Prosedyre:

Etter at stimuleringa av cellene var ferdig, vart cellene spunne ned ved maksimal hastigheit i 1 minutt. Mediet med den stimulerande forbindelsen vart fjerna. Cellepelleten vart resuspendert i 50 µl lyseringsbuffer og røyra vart satt på is i 30 minutt. Deretter vart lysatet spunne ned ved 15000 rpm i 15 minutt i ei kjølesentrifuge. Supernatanten (40 µl) vart pipetert over i nye ependorfrøyr og tilsett likt volum samplebuffer. Prøvene vart kokt ved 100 °C i 5 minutt. Prøver som ikkje vart nytta direkte til SDS-PAGE vart fryst ned i -20 °C.

### 3.4 SDS-PAGE

**Materiale:** 10% separerande og 4% konsentrerande gelløysningar, akrylamid, APS, destillert vatn, elektroforeseapparat, elektroforesebuffer, elektroforesekar, glasplater, gelstøypingsstativ, proteinstandard.

**Prosedyre:** Proteina frå lysata vart separert ved hjelp av Natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE). Natriumdodecylsulfat er ein detergent som denaturer protein, i tillegg inneheld den ei negativt lada gruppe (Sulfat). SDS bind til proteina og gir dei ein netto negativ ladning. Proteina får dermed lik ladning/masse ratio og separerast

på grunnlag av deira molekylære vekt. 10% separerande- og 4% konsentrerende gel vart nytta. 5 µl av ladder (Precision Plus protein<sup>TM</sup> Standards) og 20 µl av prøvene vart applisert i kvar brønn. Elektroforesen vart køyrt med 20 mA per gel.

### 3.5 Western blotting

**Materiale:** Blokkeringsbuffer (5% feittfri tørrmjølk), ECL, fikseringsvæske, framkallingsvæske, halvtørr blotter, kromatografipapir, metanol, polivinylden difluoridmembran (PVDF-membran), primærantistoff (tabell 3), proteinoverføringsbuffer, sekundærantistoff konjugert til HRP, vaskebuffer (1xTBS tilsett 0,1% Tween 20).

**Prosedyre:** Etter at proteina var separert ved SDS-PAGE, vart proteina overført til ein PVDF membran ved hjelp av halvtørr blotting. Den konsentrerende gelen vart fjerna og den separerande gelen vart overført til kar med transferbuffer. PDVF membranen vart fyrst aktivert 30 sekund i metanol, deretter vart den overført til kar med transferbuffer og satt på risting i fem minutt. Kromatografipapira vart lagt i bløyt i transferbuffer. Deretter vart det laga ein stabel på blottaren med fire kromatografipapir nedst, membran, gel og fire kromatografipapir på toppen. Det vart rulla over membranstabelen med ei glas pipette for å fjerne eventuelle luftbobler. Blottaren vart satt på 65 mA per gel i ein time.

Membranane vart overført til kar med blokkeringsbuffer og satt på risting i 1 time. Blokkeringsbufferen vart tilsett for å hindre uspesifikk binding av antistoffa til membranen. Deretter vart primærantistoff tilsett og membranane vart satt på risting i kjølerom over natt. Membranane vart vaska 4 x 10 minutt i TBS 0,1 % Tween 20. Membranen vart deretter inkubert med sekundærantistoff i 1 time. Konsentrasjon og type antistoff er vist i tabell 3. Deretter vart vaskesteget gjennomført att.

Membranen vart inkubert med 2 mL av substratet ECL i 5 minutt. Deretter vart membranen lagt inn i kassett og kjemiluminiscense vart detektert på røntgenfilm i mørkerom.

**Tabell 3: Oversikt over primærantistoff og sekundærantistoff som vart nytta i forsøket. Fortynningane er angitt i parentes.**

Primærantistoff	Sekundærantistoff	Deteksjon av
Anti-fosfo p44/42 MAPK (pErk) antistoff (1/1000)	HRP -konjugert Geit anti-mus Ig (GAM Ig) (1/4000)	Fosforylert Erk (pErk)
Anti-aktin antistoff (1/10000)	HRP -konjugert Geit anti-kanin IgG (1/4000)	Aktin

### 3.6 Påvising av CD63 uttrykk ved hjelp av væskestrømscytometri

**Materiale:** 96 brønnersplate (nunc), FITC- konjugert mus anti-humant CD63 antistoff, , kalibreringsvæske, plastrøyr, 4% paraformaldehyd. væskestrøm cytometer.

**Prosedyre:** Væskestrøm cytometri er ei kvantitativ metode som baserer seg på måling av fluorescens og lysspreiingssignal. Væskestrømscytometri gjer det mogleg å utføre målingar av enkeltceller og enkeltcellers innhald med stor hastigheit. Ved væskestrømscytometri styrast cellene med stor hastigheit saman med ei føringsvæske forbi ei eksitasjonslyskjelde. Denne lyskjelda er vanlegvis ein laser. Flow cytometeret har detektorar som fangar opp lys spreidd i forlengelsen av eksitasjonslyset (låginkel lysspreiing) og lys som er spreidd til siden (høginkel lysspreiing). Låginkel lysspreiing gir informasjon om storleiken til cellene. Høginkel lysspreiing gir informasjon om det granulære innhaldet i cellene. Cellene kan og fargast med fluorokrom -konjugerte antistoff mot for eksempel membranmarkørar. Flow cytometeret har eigne detektorar som fangar opp fluorescensens frå fluorokroma. Frå detektorane overførast informasjonen til ei datamaskin med spesialutvikla programvare.

Cellene vart fordelt i ependorfrøyr, med ein konsentrasjon på 1 million celler i 1 mL medium. Det vart utført tidsavhengig stimulering av cellene med trypsin og plasmin etter oppsettet som er vist i tabell 1. Etter at stimuleringa var ferdig vart cellene sentrifugert ned ved 13000 rpm i 1 min og mediet med den stimulerande forbindelsen fjerna. Cellene vart resuspendert i 100 µl PBS og overført til ei 96-brønnersplate. Deretter vart cellene vart vaska tre gonger i 1xPBS . Cellene vart inkubert med FITC-konjugert anti-CD63 antistoff (1:10) og plassert i romtemperatur 1 time. Cellene vart sentrifugert ned og vaska tre gonger i 1xPBS. Dersom

målinga ikkje vart utført same dag vart cellene fikserte i 4% paraformaldehyd. Uttrykk av CD63 vart påvist ved hjelp av væskestrømscytometri.

### 3.7 Isolering av basofile granulocytter

#### 3.7.1 Tillaging av gradient

**Materiale:** HBSS, HCl, HEPES buffer pH7.4, kjølesentrifuge, percoll, nytappa blod, sterilerøyr som inneheld EDTA, sentrifuge, polystyren sentrifugerøyr (15 mL).

**Prosedyre:** Ei stockløysning av percoll, 10XHBSS, 0.25 M HEPES buffer, og 1M HCl vart laga. Deretter vart 3 løysningar med ulik tettheit laga (Sjå 2.5 under oppskrifter). Gradienten vart laga sekvensielt ved at 4 mL av den minst tette løysninga (1.070 g/mL) fyrst vart tilsett i botnen på eit 15 mL sentrifugerøyr. Deretter vart 4 mL av løysninga med nest minst tettheit (1.079 g/mL) tilsett og til slutt vart løysninga på 1.088 g/mL tilsett i botnen på sentrifugerøret. Den mindre tette løysninga vil stige opp i røret når ei meir tett løysning vert tilsett, dette dannar så den ferdige gradienten. 4 mL blod (nytappa) vart tilsett forsiktig oppå kvar gradient og blodcellene vart sentrifugert ned ved 1200 rpm i 25 min i romtemperatur. Det øvste cellebandet vart fjerna forsiktig og overført til eit nytt 15 mL sentrifugerøyr. Cellene vart vaska 2 gonger i 1xHBSS (10 mL) og sentrifugert ned ved 1200 rpm i 7 minutt ved 4°C. Cellene vart resuspendert i 1 mL 1xHBSS og talt .

#### 3.7.2 Påvising av T-celler, B-celler og basofile granulocytter tilstade i isolert cellefraksjon ved hjelp av væskestrømscytometri

**Materiale:** 96 brønnersplate, alexa fluor 647 konjugert esel anti-mus IgG, anti-FcεRI antistoff, FITC konjugert anti-CD3 antistoff, PBS.

**Prosedyre:** Det vart teke ut celler frå den isolerte celleduspensjonen som vart overført til ei 96-brønners plate og spunne ned ved 1300 rpm i 3 minutt. Deretter vart dei vaska tre gonger i 1xPBS. Cellene vart farga med anti-CD19 antistoff (1:10), anti-CD3-antistoff (1:10) og anti-FcεRI antistoff. Plata vart pakka inn i aluminiumsfolie og plassert i romtemperatur i 1 time. Cellene vart spunne ned og vaska tre gonger i 1xPBS. Deretter vart alexa fluor 647 konjugert esel anti-mus IgG (1:200) tilsett i brønnen der cellene vart farga med anti-FcεRI.



Plata vart pakka inn i aluminiumsfolie og plassert i romtemperatur i 30-45 minutt. Cellene vart spunne ned og vaska tre gonger i 1x PBS. Deretter vart andelen av T-lymfocytar, B-lymfocytar og basofile granulocytar i cellesuspensjonen påvist ved hjelp av væskestrøms cytometri.

### 3.7.3 Negativ seleksjon (Fjerning av T-celler)

**Materiale:** Partiklar kopla til Geit anti-humant CD3 antistoff, magnet (Dynal MPC).

**Prosedyre:** Den isolerte cellesuspensjonen vart inkubert ved 4°C i 20 minutt med magnetiserbare partiklar kopla til anti-CD3 antistoff. Det vart tilsett 10 partiklar per celle (400 µl). Deretter vart røyret med cellesuspensjonen plassert i eit magnetisk felt. Partiklar med bunde celler vart festa til kanten av røyret ved hjelp av magneten, cellene som fortsatt var i suspensjon vart overført til eit nytt ependorfrøyr. Cellene vart spunne ned ved 11000 rpm i 5 minutt, supernatanten vart fjerna og cellepelleten vart fryst ned ved -80 °C.

### 3.7.4 Positiv seleksjon av basofile granulocytar

**Materiale:** Partiklar kopla til Sau anti-mus IgG, magnet (Dynal MPC).

**Prosedyre:** Cellesuspensjonen vart inkubert med anti-FcεRI antistoff (1:10) 1 time i inkubatorskap. Cellene vart sentrifugert ned ved 300 rpm i 5 minutt og mediet med antistoff vart fjerna. Deretter vart cellene inkubert i 20 minutt ved 4°C med partiklar kopla til sau anti-mus IgG. Partiklane vart tilsett i ein konsentrasjon som ga 3-4 partiklar per celle (150 µl). Deretter vart røyret med cellesuspensjonen plassert i eit magnetisk felt og cellene i løysning vart fjerna. Partiklane med bunde celler vart vaska eit par gonger i 1xHBSS og sentrifugert ned ved 11000 rpm i 5 minutt. Cellepelleten vart fryst ned i -80°C og vart nytta til isolering av RN

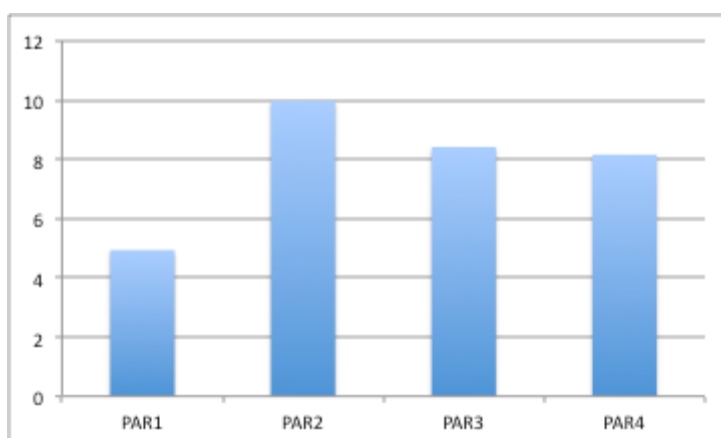
## 4 Resultat

### 4.1 Påvisning av mRNA for PAR reseptorar i KU812 cellelina

KU812 er beskrevet som ei basofil celleline og den vart nytta i denne oppgåva fordi den består av celler med basofile eigenskapar som ekspresjon av FcεRI og basofile granula i tillegg til at den produserer histamin. Som nemnd i introduksjonen er det vist at allergen med proteaseaktivitet kan aktivere basofile granulocytter direkte og at aktiverte basofile celler kan indusere T<sub>H</sub>2 immunrespons. Det er serinproteaser som er mest kjent for å aktivere PAR reseptorane. I innleiande forsøk vart difor ekspresjonen av PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4 i KU812 celler undersøkt ved hjelp av realtime-PCR (qPCR). RNA vart isolert frå cellene og det vart utført cDNA syntese ved hjelp av reverstranskriptase PCR. cDNA vart kvantitert ved qPCR med genspesifikke primere for PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4 (figur 9).

Syklusgrenseverdien (Ct) angir antalet PCR-syklusar til ei prøve når den når den fastsette grenseverdien. Verdien for referansegnet (GAPDH) vart trekt frå Ct verdien til prøvene, noko som ga endringa i syklusgrenseverdi ( $\Delta$ Ct). Denne verdien gir ein indikasjon på kor mykje RNA som det opprinneleg var i prøven men er ikkje kvantitativ sidan effektiviteten til primerne ikkje vart testa. Ein fullstendig dobling av transkript per syklus krev at primerene har 100% effektivitet.

#### Påvisning av mRNA for PAR reseptorar ved qPCR i KU812



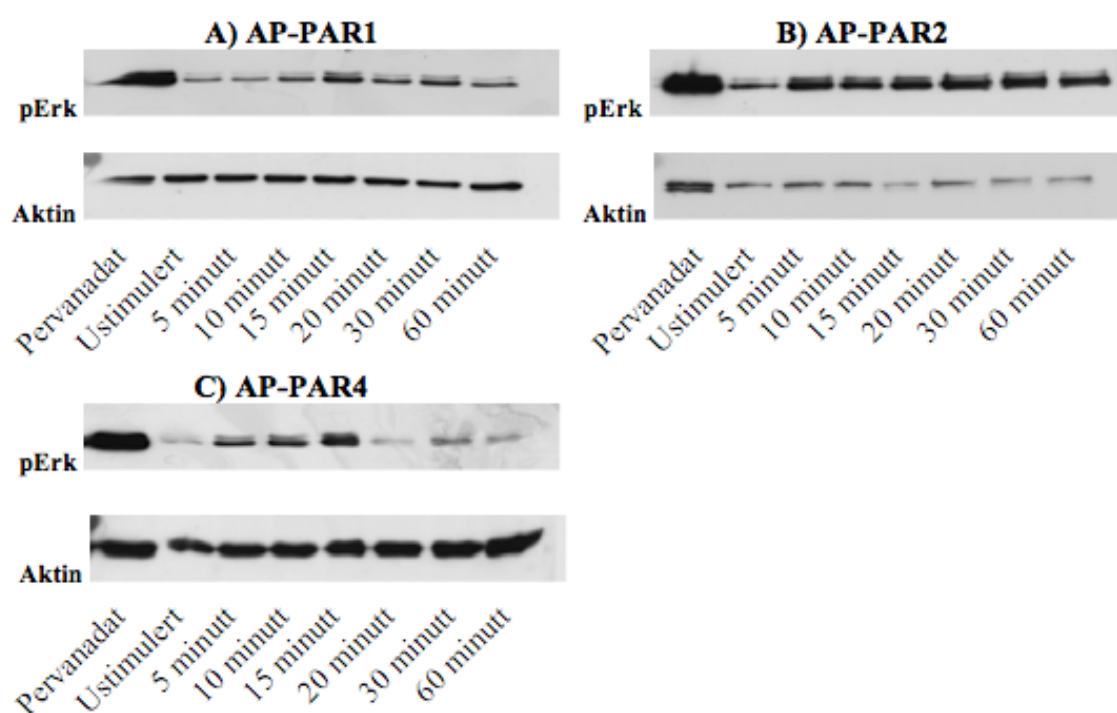
**Figur 9:** Figuren viser endringa i syklusgrenseverdi ( $\Delta$ Ct) til mRNA for PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4 frå KU812 celler. mRNA vart kvantitert ved qPCR med spesifikke primere for PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4. Låg  $\Delta$ Ct verdi indikerer meir mRNA i den opphavlege prøven. Forsøket vart utført som beskrevet i kapittel 3.2 under metode del.

Resultata frå qPCR reaksjonen viste at transkript frå alle fire PAR reseptorane var tilstade i KU812 cellene.

## 4.2 Effekt av dei syntetiske peptida AP-PAR1, AP-PAR2 og AP-PAR4 på fosforylinga av Erk

Sidan det vart påvist mRNA for PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4, vart det undersøkt om desse transkripta var translert og uttrykt som funksjonelle overflate reseptorar i KU812 cellelina. Cellene vart stimulert med aktiverande peptid (AP) for PAR1, PAR2 og PAR4. Ettersom det ikkje finst noko AP for PAR3 vart dette forsøket ikkje utført. Det vart utført tidsavhengige forsøk, med same konsentrasjon peptid (100nM) for å få etablert ei eventuell kinetikkurve over fosforylinga av Erk. Erk vart nytta som markør fordi PAR er vist å aktivere MAPK signalvegen, og fosforylert Erk fungerer som ein transkripsjonsaktivator.

AP-PAR1, AP-PAR2 og AP-PAR4 aktiverte dei respektive PAR reseptorane i celler frå KU812 cellelinen (Figur 10).

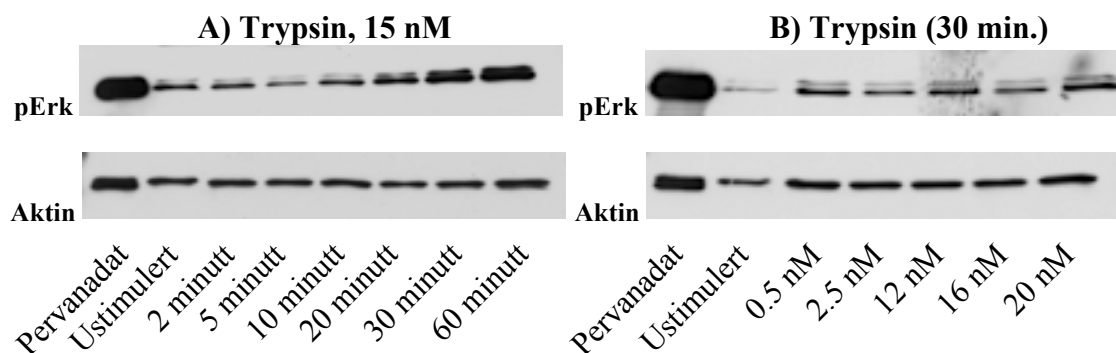


**Figur 10:** Figuren viser resultata frå stimulering med aktiverandepeptid for PAR. Lysata vart analysert ved western blotting og immunoblota vart inkubert med anti-fosfo p42/p44 Erk (MAPK) antistoff. Figuren viser immunoblot av lysat frå celler stimulert med A)AP-PAR1, B) AP-PAR2 og C) AP-PAR3 i dei gitte tidsintervalla. Som positiv kontroll vart ei løysning av pervanadat og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nytta. For å verifisere at det var lik mengde protein i alle prøvene vart membranen inkubert med anti-aktin antistoff. Forsøka vart reproduisert tre gonger.

Resultata frå forsøka viste at AP-PAR1 induserte fosforylering av Erk etter 10 minutt med ein topp i fosforyleringa etter 15 minutt. AP-PAR4 induserte fosforylering etter 5 minutt med ein topp i fosforyleringa etter 15 minutt. Fosforyleringa av Erk vart kraftig redusert etter 15 minutt men held seg på eit nivå litt sterkare enn den negative kontrollen. AP-PAR2 induserte og fosforylering etter 5 minutt, med ein fosforyleringstopp etter 30 minutt. Fosforyleringa av Erk var kraftig ut varigheita av forsøket. Resultata i figur 10 er representative for tre oppsett.

### 4.3 Stimulering med trypsin gir aktivering av Erk

Trypsin er ein naturleg aktivator for PAR2 og PAR4 (Nystedt et al. 1994; Vu et al. 1991). Sidan det vart påvist funksjonelle overflatereseptorar for PAR2 og PAR4 vart det utført stimuleringsforsøk med trypsin for å undersøkje om denne serinproteasen førte til fosforylering av Erk. KU812 celler vart stimulert med 15 nM trypsin ved ulike tider for å få danna ei eventuell kinetikkurve over fosforyleringa av Erk. Det vart og utført eit dose-respons forsøk, der stimuleringane føregjekk i 30 minutt. (Figur 11).



**Figur 11: Effekt av trypsin på fosforylering av Erk 1/2 i KU812 celledelen. Figuren viser immunoblot av lysat frå celler stimulert med A) 2.5 nM trypsin B) 15 nM trypsin og C) ulike konsentrasjonar av trypsin. Immunoblotta vart inkubert med anti-fosfo p42/p44 Erk (MAPK) antistoff. Som positiv kontroll vart ei løysning av pervanadat og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nytta. For å verifisere lik mengde protein i alle prøvene vart immunoblottet inkubert med anti-aktin antistoff. Forsøka vart reproduisert to gonger.**

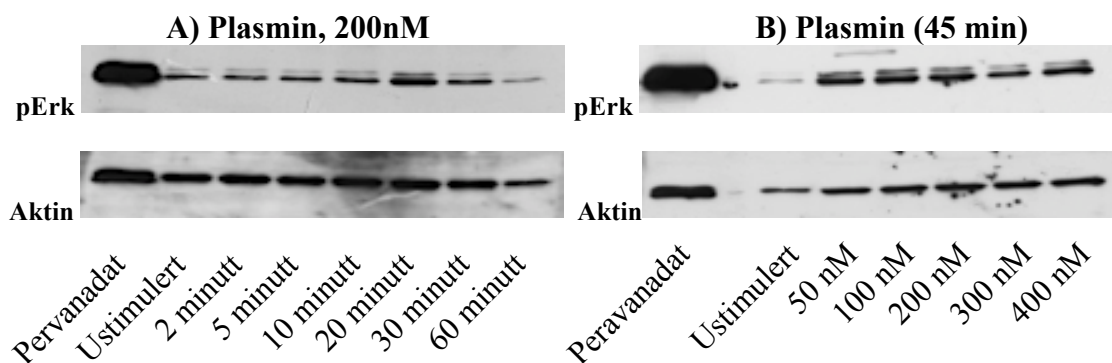
Resultata frå forsøka viste at 15 nM trypsin induserte fosforylering av Erk etter 20 minutt, med ein topp i fosforyleringa etter 60 minutt. Resultata frå doserespons forsøket viste at alle dei ulike konsentrasjonane av trypsin hadde ei effekt på fosforyleringa av Erk.

Konsentrasjonane 0.5 nM, 12 nM og 20 nM ga størst effekt. Resultata i figur 11 er representative for to oppsett.

#### 4.4 Effekten av plasmin på aktiveringa av Erk

Det er i litteraturen vist at plasmin kan aktivere PAR1 og PAR4. Plasmin er ei serinprotease som og er funne i mjølk. Dersom det vert påvist fosforylering av Erk med bovin plasmin kan det tyde på at serinproteaser i mjølk kan utøve ei effekt på basofile granulocytter dersom dei er teke opp som funksjonelle protein over tarmen.

KU812 cellene vart fyrst stimulert med plasmin frå storfe (200 nM) ved ulike tidspunkt (figur 12 A). Det vart og utført eit doseresponsforsøk der cellene vart stimulert i 45 minutt med ulike konsentrasjonar av plasmin (figur 12 B). Denne tida vart valt ettersom det var gjennomsnittstida for maksimal fosforylering av Erk på dei separate blotta.



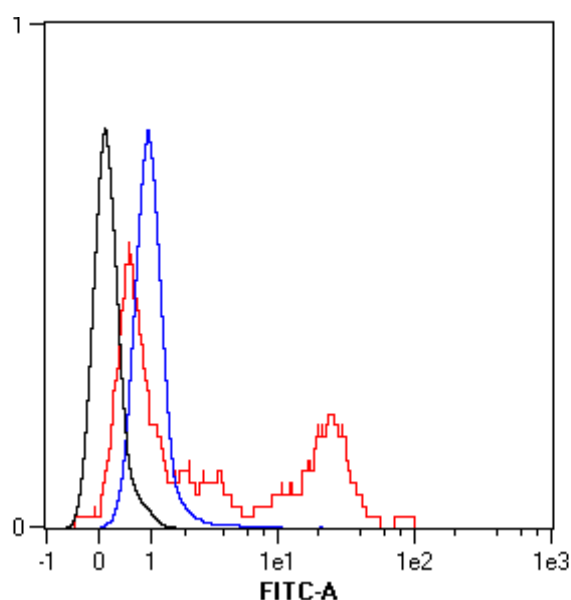
**Figur 12: Effekt av plasmin på fosforylering av Erk.** Lysata vart analysert ved western blotting etter metoden som er beskrive i kapittel 3.5 i metodedel. Figuren viser immunoblot av lysat frå celler stimulert med A) plasmin (200 nM) og B) plasmin doserespons, med konsentrasjonane som er angitt i figuren. Som positiv kontroll vart ei løysning av pervanadat og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nytta. Membranen vart inkubert med antistoff mot aktin for å verifisere lik mengde protein i alle prøvene. Immunoblot A vart reproduisert tre gonger, immunoblot B vart reproduisert to gonger.

Resultata frå forsøka viste at plasmin induserte fosforylering av Erk etter 20 minutt i to separate oppsett, i eit tredje oppsett kom fosforyleringa av Erk seinare (etter 60 min). Etter 20 minutt var det ein nedgang i fosforyleringa til omlag same nivå som negativ kontroll.

Resultatet frå doserespons forsøket viste at alle dei ulike konsentrasjonane hadde ei effekt på fosforyleringa av Erk. Men det var ingen doseavhengigrespons.

## 4.5 Isolering av basofile granulocytter frå fullblod

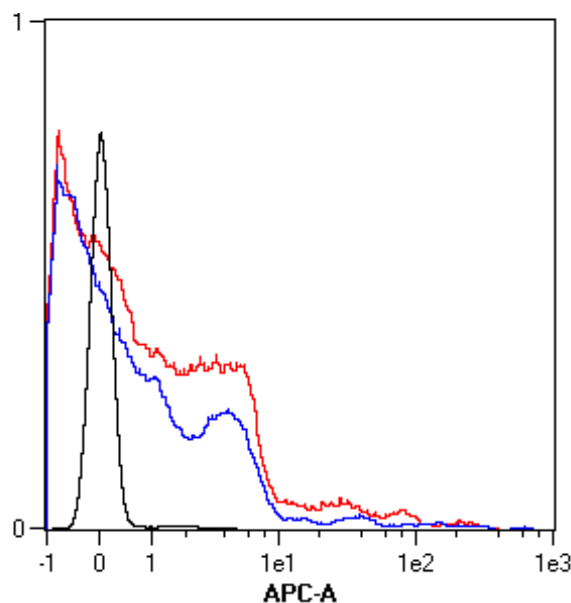
Det vart og utført forsøk på primære basofile granulocytter for å undersøkje om desse oppførte seg likt som KU812 cellene i forhold til uttrykk av PAR og effekt av trypsin og plasmin på uttrykket av CD63. Basofile granulocytter vart isolert frå fullblod ved gradientsentrifugering i percoll etter metoden som er beskrive i kapittel 3.7 i metodedel. Cellepreparatet vart undersøkt for B-celler, T-celler og FcεRI- positive (FcεRI<sup>+</sup>) celler ved væskestrømscytometri. FcεRI er uttrykt i basofiler, mastceller, nøytrofiler og eosinofiler. I følgje prosedyren for isolering av basofile granulocytter ved gradientsentrifugering i percoll legg nøytrofiler og eosinofiler seg i det nedste cellebandet, medan basofile granulocytter legg seg i eit anna celleband. Difor vart antistoff mot FcεRI nytta for å undersøkje om basofile granulocytter var tilstade i den isolerte cellesuspensjonen. Ved væskestrømscytometri vart det påvist at det var ein del T-celler tilstades i den isolerte cellesuspensjonen. Det vart difor utført negativ seleksjon, der cellene vart inkubert med partiklar kopla til antistoff mot CD3. CD3 er hjelpereseptor for T-cellereseptor og er dermed ein spesifikk markør for T-celler. Cellepreparatet vart farga med antistoff mot CD3 før og etter T-celle depleksjon og analysert ved væskestrømscytometri (figur 13).



Figur 13: Figuren viser histogram frå væskestrømscytometrisk påvisning av CD3-positive celler. Raud kurve viser CD3-positive celler før T-celle depleksjon, blå kurve viser CD3-positive celler etter T-celle depleksjon og svart kurve viser ufarga celler. På grunn av variasjon i antal celler er kurvene normalisert.

Resultatet frå T-celle deplesjon viste at om lag alle T-cellene var fjerna (Figur 13). Populasjonen med høg ekspresjon av CD3 var heilt borte, i tillegg var det meste av populasjonen med ein lågare ekspresjon av CD3 og fjerna.

I same forsøk vart det og analysert for FcεRI-positive celler før og etter T-celle deplesjon for å undersøkje andelen av FcεRI-positive celler som var tilstade i cellepreparatet (Figur 14).



**Figur 14:** Figuren viser resultatata frå påvisning av FcεRI-positive celler ved væskestrømscytometri. Cellene vart farga med primærantistoff mot FcεRI og med sekundær antistoff konjugert til Alexa Fluor 647. Svart kurve viser ufarga celler, raud kurve viser FcεRI før T-celle deplesjon og blå kurve viser FcεRI<sup>+</sup>-celler etter T-celle deplesjon. På grunn av varierende antal av celler vart kurvene normalisert.

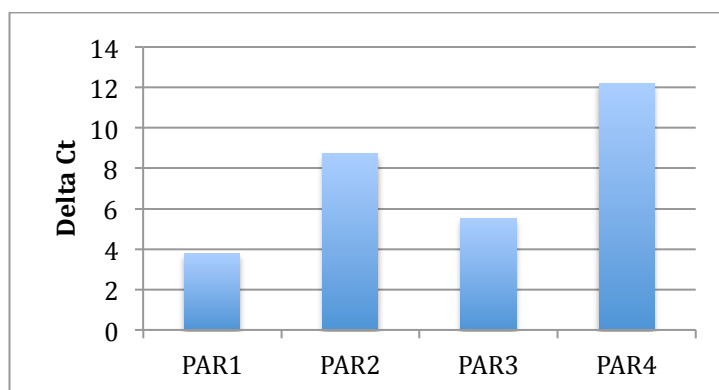
Resultata viste at det var FcεRI-positive celler i cellepreparatet. Det vart ein liten populasjon med høgt uttrykk av FcεRI og ein større populasjon med eit lågare uttrykk av FcεRI. FL-kanalen som vart nytta til å detektere fluorescensen var ikkje kalibrert så det kan tenkjast at det kan forklare kvifor fluorescensen i farga celler er redusert i forhold til ustimulert.

## 4.6 qPCR på mRNA frå primærceller

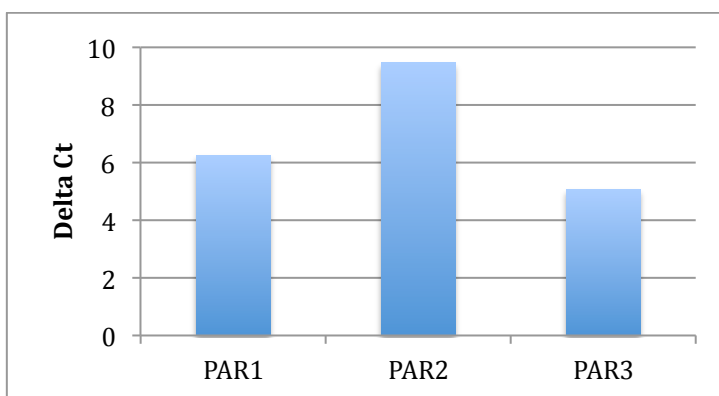
Sjølv om det vart påvist PAR reseptorar i KU812 celler er det ikkje sikkert at primære basofile granulocytter inneheld mRNA for PAR. KU812 er beskrive som ei celleline med basofile eigenskapar, men desse cellene kan oppføre seg forskjellig frå primærceller. Det vart

difor isolert RNA frå primærceller og utført qPCR med spesifikke primere for PAR1, PAR2, PAR3 og PAR4 (Figur 15). Primære basofile granulocytter vart isolert på to ulike måtar. Gradientsentrifugering vart kombinert med negativ seleksjon med anti-CD3 antistoff eller positiv seleksjon med monoklonalt anti-FcεRI antistoff. Sidan basofile granulocytter vart isolert ved både positiv og negativ seleksjon vart RNA isolert frå cellepreparat frå begge seleksjonsmetodane og uttrykket av PAR vart samanlikna.

#### A) mRNA frå basofile granulocytter isolert ved negativ seleksjon



#### B) mRNA frå basofile granulocytter isolert ved positiv seleksjon



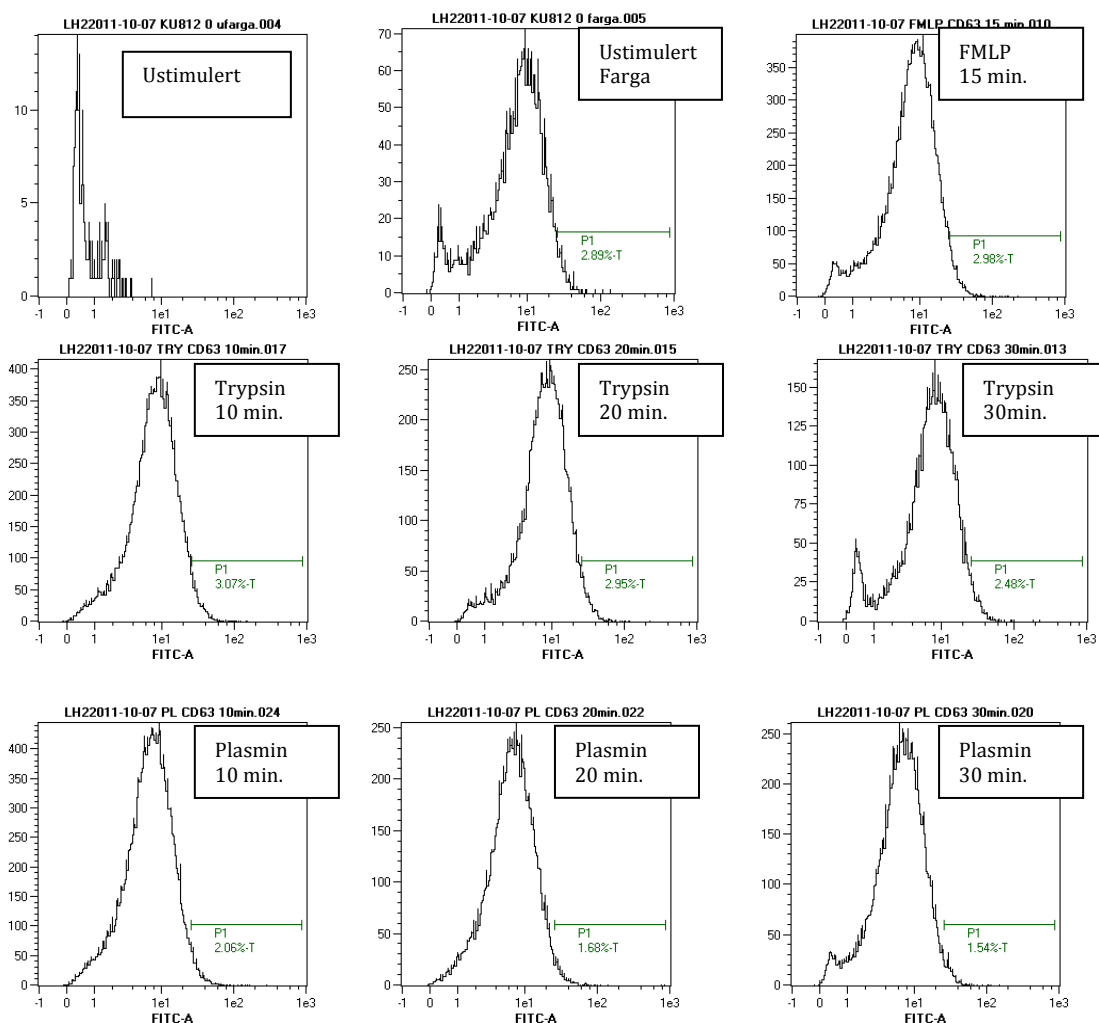
**Figur 15:** Det vart undersøkt om basofile granulocytter inneheldt mRNA for PAR ved RT-PCR. RNA vart isolert frå basofile celler isolert ved negativ seleksjon og ved positiv seleksjon. Figuren viser  $\Delta$ Ct verdi for mRNA som koder for PAR frå A) basofile granulocytter isolert ved negativ seleksjon, B) basofile granulocytter isolert ved positiv seleksjon.

Resultata viste at basofile granulocytter isolert ved positiv seleksjon inneheld mRNA for PAR1, PAR2 og PAR3. Cellepreparatet isolert ved negativ seleksjon inneheldt og mRNA for PAR4.

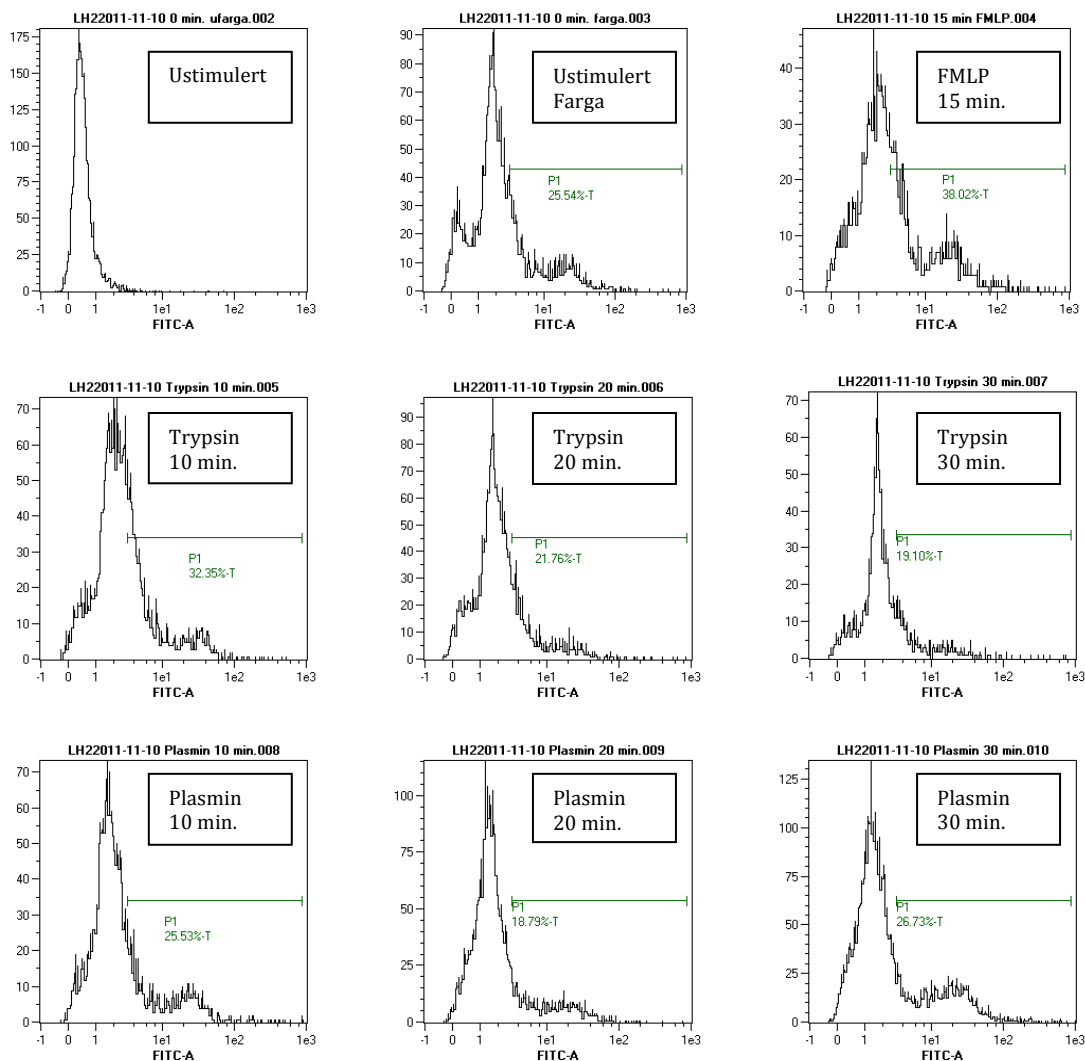


#### 4.7 Effekt av trypsin og plasmin på CD63 uttrykksnivå

CD63 er ein membranmarkør som er assosiert med granula membranen i basofile granulocytter. Denne membranmarkøren er nytta som ein aktiveringsmarkør for å påvise allergi i basofilaktiveringstest. Det vart difor utført stimuleringar med trypsin (15 nM) og plasmin (200 nM) i eit tidsavhengig forsøk for å undersøkje om desse proteasene førte til degranulering og uttrykk av CD63 i KU812 celler og primærceller (Figur 16 og 17).



**Figur 16:** Effekt av plasmin og trypsin på uttrykk av CD63 i celler frå KU812 cellelinen. Cellene vart stimulert med trypsin og plasmin ved ulike tider (10, 15, 20, 30, 45 og 60 min.). I denne figuren er histogram av CD63 uttrykk (x-akse) vist for celler stimulert med trypsin eller plasmin i 10, 20 og 30 minutt. Som positiv kontroll vart fMLP (2  $\mu$ M) nytta. Cellene vart farga med FITC-konjugert antistoff mot CD63 og analysert ved hjelp av væskestrømscytometri. Ustimulerte celler vart og farga for å undersøkje bakgrunns ekspresjonen av CD63. Y-aksen viser antal teljingar og x-aksen viser relativ fluorescensintensitet. Forsøket vart reproduisert to gonger.



**Figur 17: Effekt av plasmin og trypsin på uttrykk av CD63 i primærceller. I denne figuren er histogram av CD63 uttrykk (x-akse) vist for primærceller stimulert med trypsin eller plasmin i 10, 20 og 30 minutt. Som positiv kontroll vart fMLP (2  $\mu$ M) nytta. Cellene vart farga med FITC-konjugert antistoff mot CD63 og analysert ved hjelp av væskestrømscytometri. Ustimulerte celler vart og farga for å undersøkje uttrykket av CD63 i cellene frå før. Y-aksen viser antal teljingar og x-aksen viser relativ fluorescensintensitet. Dette forsøket vart utført ein gong.**

Resultata frå desse forsøka viste at plasmin og trypsin ikkje førte til auka uttrykk av CD63 utover det som allereie var uttrykt i cellene frå før. Med unntak av at det var ei svak auke i uttrykket av CD63 i primærceller stimulert med trypsin i 10 minutt. KU812 celler hadde eit høgt bakgrunnsnivå av CD63. Forsøket med primærceller vart utført ein gong medan forsøket med KU812 celler vart reproduisert to gongar.

## 5 Diskusjon

PAR reseptorar er regulert av serinproteaser. For å studere proteaser i mat sin effekt på basofile granulocytter var det fyrst viktig å undersøkje om desse cellene inneheldt PAR reseptorar både på mRNA og proteinnivå. I tillegg var det viktig å undersøkje om bovint plasmin og trypsin kunne indusere fosforylering av Erk.

I denne oppgåva vart KU812 cellelina nytta som modell for basofile granulocytter. KU812 er ei basofil celleline som vart etablert frå perifert blod frå ein pasient med kronisk myolegen leukemi (Kishi 1985). KU812 er i fleire studie nytta som modell for differensiering av basofile granulocytter (Blom et al. 1992; Valent et al. 1990). I tillegg er den nytta i studie der det vart undersøkt kva for effekt serinproteaser har på basofile granulocytter (Phillips 2003). KU812 er i følge litteraturen positive for FcεRI, inneheld granula og produserer histamin. I tillegg er den negativ for lymfoide markørar som CD2 og CD19 (Kishi et al. 1985).

I innleiande forsøk vart det påvist mRNA for alle PAR-reseptorane i KU812 celler.

KU812 cellene inneheldt mest mRNA for PAR1 og minst mRNA for PAR2 (Sjå figur 9).

Resultata frå dette forsøket samsvarer delvis med tidlegare studie som har påvist mRNA for PAR1, PAR3 og PAR4 i KU812 (Yamaguchi 2008). mRNA for PAR2 reseptor har ikkje før vorte påvist i KU812. I denne oppgåva vart funksjonell PAR2 påvist ved stimuleringsforsøk med aktiverande peptid for PAR2. Sjølv om det har vore påvist mRNA for PAR reseptorar i cellelina frå før er det viktig å få verifisert ekspresjonen i den cellelina som det arbeidast med. Det kan vere variasjonar i eigenskapar til celler frå den same cellelina i ulike laboratorium. Blant anna kan ulik behandling og vekstforhold selektere for celler med andre eigenskapar.

MAPK som markørar for PAR aktivering er vist i ei rekkje studie i andre cellulære system. I eosinofile granulocytter fører aktivering av PAR2 til fosforylering av Erk, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1 og 2 og p38 mitogen aktivert kinase (Temkin et al. 2002). I ei luftvegsepitelcelleline er det vist at aktivert PAR induserer fosforylering av Erk 1/2 og JNK og produksjon av IL-8 (Ostrowska & Reiser 2008). Fosforylering av Erk er og vist ved aktivering av PAR i humane tarmepitelceller (Fyfe et al. 2005; Wang et al. 2010). Erk og andre MAPK som markørar for PAR aktivering i andre celletypar er difor grundig rapportert i litteraturen.

Både AP1, AP2 og AP4 induserte fosforylering av Erk i KU812, med ein topp i fosforyleringa etter 15 minutt (AP1 og AP4) og etter 30 minutt (AP2) (Sjå figur 10). Forsøka viste difor at både PAR1, PAR2 og PAR4 er funksjonelle overflatereseptorar i KU812. Om PAR3 var tilstades som funksjonell overflatereseptor vart ikkje undersøkt ettersom det ikkje finst noko aktiverande peptid for PAR3. Funksjonell PAR1 er tidlegare påvist i KU812 (Yamaguchi 2008).

Plasmin kan i følgje litteraturen aktivere PAR1 og PAR4 (Pendurthi 2002; Quinton et al. 2004), medan trypsin kan aktivere PAR2 og PAR4 (Nystedt et al. 1994) PAR er uttrykt i både immunceller og ei rekkje andre celletypar. I følgje litteraturen er aktivering av PAR forbunde med utvikling av allergi i luftvegane (Ebeling et al. 2007; Schmidlin et al. 2002; Shpacovitch et al. 2004). Mine studie viser at bovint plasmin og trypsin induserte fosforylering av Erk i ein reaksjon som var tidsavhengig men ikkje konsentrasjonsavhengig i KU812 (Sjå figur 11 og 12). Dette er fyrste gong det er vist at plasmin frå mjølk kan indusere aktivering av Erk i basofile granulocytтар. Sjølv om plasmin og er tilstades i blodet hjå menneske, er det ikkje sikkert at humant og bovint plasmin har lik katalytisk aktivitet. Bovint og humant plasminogen som er den inaktive forma av plasmin, inneheld dei same strukturelle og funksjonelle domena, men har ulik aminosyresamansetning og sekvens. Aminosyrene som utgjer det aktive sete i bovint plasmin er flytta fire residuar mot N-terminal ende i forhold til dei same aminosyrene i humant plasmin. Analyse på sekvensnivå har vist at proteasedomenet i bovint plasminogen er 80% identisk med proteasedomenet i humant plasminogen (Shaller et al. 1985). Humant plasminogen inneheld og bindingsete for streptokinase i proteasedomenet noko bovint plasminogen manglar (Shaller et al. 1985). Etersom PAR1, PAR2 og PAR4 reseptorane vart vist å vere funksjonelt uttrykt i forsøk med aktiverande peptid er det grunn til å tru at plasmin og trypsin aktiverer basofile granulocytтар via PAR.

I litteraturen er det beskrive fleire forsøk med proteaseallergen og aktivering av basofile granulocytтар og deira funksjon i utvikling av allergi i luftvegane (Phillips 2003; Sokol et al. 2008; 2009). Dei fleste av desse forsøka har vore utført i mus (Perrigou et al 2009; Sokol et al 2008; 2009; Yoshimoto et al 2009). Men nokre har og vore utført på humane basofile granulocytтар (Phillips 2003; Yoshimoto et al. 2009). Forsøka utført med plasmin og trypsin i denne oppgåva viser at serinproteaser i næringsmidlar kan utøve ei effekt på basofile celler *in*

*vitro*. Men for at dette skal kunne relaterast til utvikling av allergi mot matvareallergen er det mange faktorar som det må takast omsyn til. Effekten av serinproteaser på basofile celler i litteraturen er basert på forsøk med allergen med serinproteaseaktivitet som ein eksponerast for i luftvegane. Allergen som ein eksponerast for via luftvegane er ikkje utsett for same forhold som allergen ein eksponerast for via mage-tarm kanalen. Matvareallergen er blant anna utsett for låg pH og fordøyelesesekret som bryt dei ned til mindre komponentar. Dersom serinproteaser i næringsmidlar som til dømes i mjølk skal kunne utøve ei effekt på det medfødde immunforsvaret krev det at dei er teke opp over tarmen i intaktform. I følgje ein oversiktsartikkel tek eit vakse menneske opp intakte antigen som svarer til  $10^{-5}$  av det daglege inntaket (Brandtzaeg 2011). Dette inneber at ein stor del intakte antigen kan kome i kontakt med det lokale immunforsvaret lokalisert i tarmen. Som beskrive i innleiinga er plasmin funne å vera assosiert med kaseinmiceller i mjølk og i følgje litteraturen vert kaseinmiceller teke opp via Peyerske flekkar (Roth-Walter 2008). Det kan difor tenkjast at plasmin er beskytta mot fordøyelse enzyma i tarmen og at den på denne måten takast opp gjennom tarmen i intakt form. Det er heller ikkje klart om plasmin og andre serinproteaser i næringsmidlar kan aktivere basofile celler slik at dei kan indusere ein  $T_H2$  immunrespons. Allergen med serinproteaseaktivitet som ein eksponerast for i luftvegane er vist å ha denne effekten, men det er og viktig at dette vert vist for serinproteaser i næringsmiddel.

Det vart undersøkt om T-celler, B-celler og Fc $\epsilon$ RI-positive celler var tilstades i cellepreparatet frå sentrifugering i Percollgradient. Bandet i midten som skulle innehalde ei større mengd av basofile granulocytter vart ikkje observert. Difor vart celler frå det øvste cellebandet isolert. Eigentleg burde det ha vorte undersøkt for alle dei ulike cellypane som ein kan finne i blod var tilstade i cellepreparatet. Resultata frå negativ seleksjon av basofile granulocytter viste at omlag alle T-cellene var fjerna (sjå figur 13) og at det var ei mengde Fc $\epsilon$ RI-positive celler tilstades i cellepreparatet (sjå figur 14).

Ved positiv seleksjon vart basofile granulocytter selektert basert på deira uttrykk av Fc $\epsilon$ RI. Det vart ikkje undersøkt om nøytrofile og eosinofile granulocytter var tilstades i det isolerte cellepreparatet, da det er kjent at desse og uttrykkjer Fc $\epsilon$ RI. I følgje prosedyren skal nøytrofile og eosinofile granulocytter danne eit band nedst i gradienten, men ein kan ikkje utelukke at nokre av desse og kan verte funne i det andre cellebandet i gradienten. Det er i litteraturen påvist at monocytter uttrykkjer Fc $\epsilon$ RI (Reischl et al. 2006), men reseptoren er ikkje konstant uttrykt i monocytter slik som i basofile og mastceller (Reischl et al. 2006).

Det vart påvist mRNA for PAR i cellepreparata isolert ved både negativ seleksjon og positiv seleksjon (Sjå figur 13). Basofile granulocytter isolert ved positiv seleksjon inneheldt mRNA for PAR1-3, medan cellepreparatet etter negativ seleksjon inneheldt mRNA for alle PAR reseptorane. Dette kan tyde på at cellepreparatet etter positiv seleksjon var reinare enn cellepreparatet etter negativ seleksjon. Det er difor sannsynleg at PAR4 ikkje er uttrykt i primære basofile granulocytter. Sidan qPCR er ein svært sensitiv teknikk, kan kontaminering av berre eit fåtal av andre celler gi utslag. Det kan difor ikkje utifrå dei forsøka som vart utført i denne oppgåva seiast med sikkerheit om primære basofile granulocytter uttrykkjer PAR 1-3, men det er sannsynleg at hovuddelen av cellene isolert ved positiv seleksjon er basofile granulocytter og at uttrykket av PAR1-3 er representativt for desse.

I basofil aktiveringstest (BAT) er CD63 nytta som markør for IgE-mediert aktivering av basofile granulocytter. I denne oppgåva vart det difor undersøkt om trypsin og plasmin og kunne utøve ei effekt på ekspresjonen av CD63 i basofile granulocytter. Stimulering med trypsin og plasmin førte ikkje til auka uttrykk av CD63 i verken KU812 celler eller i primærceller. KU812 cellene hadde eit høgt bakgrunnsnivå av CD63, noko som tyder på at desse cellene er CD63 positive frå før og dermed ikkje særleg eigna for studie av CD63. Stimulering med plasmin eller trypsin ga ikkje noko auke i uttrykket av CD63. Dette forsøket vart og utført på primærceller, der det var ei svak auke i uttrykk av CD63 ved stimulering med fMLP (positiv kontroll). fMLP er ein uspesifikk aktivator som fører til degranulering av granulocytter. I basofilaktiveringstest (BAT) er prøvene evaluerbare dersom positiv kontroll fører til minst 10% auke i ekspresjonen av CD63 i forhold til bakgrunnsekspresjonen (Eberlein et al. 2010). Stimulering med positivkontroll i primærceller førte til meir enn 10% auke i uttrykket av CD63, difor kan resultatata reknast som evaluerbare. Stimulering med plasmin eller trypsin induserte ikkje noko aukiing i uttrykket av CD63. I følgje litteraturen induserer ikkje proteaser degranulering av basofile celler (Sokol et al 2008). Sidan CD63 er assosiert med granulamembranen kan det utifrå forsøka og det som er beskrive i litteraturen tyde på at plasmin og trypsin aktiverer ein annan signaleringsveg som ikkje fører til at cellene degranulerer. Dermed vert ikkje CD63 uttrykt på membranoverflaten. Det er påvist at aktivering av PAR reseptorar spesielt PAR2 er viktig i utvikling av luftvegsallergi (Ebeling et al. 2007; Page et al. 2010). Det er difor grunn til å tru at proteasemediert aktivering av PAR reseptorar på celler som inngår i det medfødde immunforsvaret og kan spele ei rolle i utvikling av matvareallergi.

## Framtidige forsøk

I denne oppgåva vart det påvist at plasmin og trypsin aktiverer PAR i KU812 og at Erk er ein betre markør for å studere effekten av serinproteaser på basofile granulocytter enn CD63 som er nytta i BAT. Det er mange forsøk som må utførast i framtida for å kunne stadfeste at serinproteaser i mjølk og andre næringsmidlar kan ha ein funksjon i utviklinga av matvareallergi. For å undersøkje om plasmin er teke opp over tarmen i intakt form kan for eksempel mjølkefraksjonar verte utsett for ulike forhold som liknar forholda protein er utsett i mage-tarm kanalen. Proteina kan deretter verte analysert ved westernblotting med spesifikt antistoff mot bovint plasmin. Det er og rapportert at plasmin kan eksistere som midiplasmin. Midiplasmin består av proteasedomenet og kringle 4 og 5 og er eit resultat av den autokatalytiske effekten til plasmin. Denne forma av plasmin har 100% aktivitet. Det kan difor tenkjast at avhengig av kvar plasmin vert kløyvd av fordøyelsesenzym, kan det vere att fragment av plasmin som beheld proteaseaktiviteten. I litteraturen er det og beskrive forsøk der kringle 1-4 er fjerna frå proenzymet med elastase og at den resulterande forma av plasmin etter behandling med PA har omlag same katalytiske eigenskapar som heilengde plasmin (Christensen et al. 1995). I tillegg er det viktig å undersøkje om plasmin eller andre serinproteaser i mjølk kan indusere utvikling av ein  $T_H2$  immunrespons. Sjølv om det vart påvist serinproteasemediert aktivisering av Erk i denne oppgåva, veit vi ikkje noko om dette kan føre til utskiljing av IL-4. IL-4 er eit cytokin som er viktig i induksjon av  $T_H2$  celler og basofile granulocytter er vist å kunne produsere store mengder med tidleg IL-4 som i sin tur er med på å indusere utvikling av  $T_H2$  celler (Sokol et al 2008).

Det må og kartleggjast kva til rolle serinproteaser kan ha i utvikling av matvareallergi, det vil seie om dei fungerer som bakgrunnsaktivatorar av det medfødde immunforsvaret som gjer at basofile granulocytter byrjar å uttrykkje HLA klasse II molekyl og koreseptorar som gjer at dei kan fungere som APC i tillegg til at dei kan skilje ut IL-4 og andre type 2 cytokin. Og om dei i tillegg til å fungere som bakgrunnsaktivatorar og kan fungere som allergen. Det kan blant anna undersøkjast om mjølkeallergikarar inneheld IgE antistoff mot bovint plasmin.

## 6 Referanser

- Aalberse, R. C. (2000). Structural biology of allergens. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 106 (2): 228-38.
- Akers, I. A., Parsons, M., Hill, M. R., Hollenberg, M. D., Sanjar, S., Laurent, G. J. & McNulty, R. J. (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278 (1): L193-201.
- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A. & Leonard, W. J. (2005). A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *The Journal of experimental medicine*, 202 (6): 829-39.
- Amsen, D., Blander, J. M., Ryol Lee, G., Tanigaki, K., Honjo, T. & Flavell, R. A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell Press*, 117 (4): 515-26.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M. F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D. G., Austen, K. F. & Akashi, K. (2005). Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (50): 18105-10.
- Bastian, E. D. & Brown, R. J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *International Dairy Journal*, 6 (5): 435-57.
- Blaser, K., Carballido, J., Faith, A., Cramer, R. & Akdis, C. (1998). Determinants and mechanisms of human immune responses to bee venom phospholipase A2. *Int Arch Allergy Immunol.*, 117 (1): 1-10.
- Blázquez, A. B., Mayer, L. & Berin, M. C. (2010). Thymic stromal lymphopoietin is required for gastrointestinal allergy but not oral tolerance. *Gastroenterology*, 139 (4): 1301-9.
- Blom, T., Huang, R., Aveskogh, M., Nilsson, K. & Hellman, L. (1992). Phenotypic characterization of KU812, a cell line identified as an immature human basophilic leukocyte. *European Journal of Immunology*, 22 (8): 2025-32.
- Brandtzaeg, P. (2011). The gut as communicator between environment and host: Immunological consequences. *European journal of pharmacology*, 668 Suppl 1: S16-32.
- Buhring, H., Streble, A. & Valent, P. (2004). The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as marker for cell activation and allergy diagnosis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 133: 317-29.



- Buhring, H. J., Simmons, P. J., Pudney, M., Muller, R., Jarossy, D., van Agthoven, A., Willheim, M., Brugger, W., Valent, P. & Kanz, L. (1999). The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*, 94 (7): 2343-54.
- Buhring, H. J. (2001). The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3. *Blood*, 97 (10): 3303-3305.
- Böhm, S. K., Kong, W., Brömme, D., Smeekens, S. P., Anderson, D. C., Connolly, A., Kahn, M., Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Payan, D. G., et al. (1996). Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor 2. *The Biochemical Journal*, 314 (Pt 3): 1009-16.
- Chapman, M. D., Pomes, A., Breiteneder, H. & Ferreira, F. (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 119 (2): 414-20.
- Chen, J., Ishii, M., Wang, L., Ishii, K. & Coughlin, S. R. (1994). Thrombin Receptor Activation: Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *The journal of biological chemistry*, 269 (23): 16041-5.
- Christensen, S., Sottrup-Jensen, L. & Christensen, U. (1995). Stopped-flow fluorescence kinetics of bovine alpha 2-antiplasmin inhibition of bovine midiplasmin. *Biochemical Journal*, 305: 97-102.
- Colognato, R., Slupsky, J. R., Jendrach, M., Burysek, L., Syrovets, T. & Simmet, T. (2003). Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood*, 102 (7): 2645-52.
- Coughlin, S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3 (18): 1800-14.
- D'Andrea, M. R., Rogahn, C. J. & Andrade-Gordon, P. (2000). Localization of protease-activated receptors-1 and -2 in human mast cells: indications for an amplified mast cell degranulation cascade. *Biotech Histochem.*, 75 (2): 85-90.
- Déry, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M. & Bunnet, N. W. (1998). Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *American Journal of Physiology - Cell physiology*, 274 (6): 1429-52.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3 utg.: Wiley.
- Ebeling, C., Lam, T., Gordon, J. R., Hollenberg, M. D. & Vliagoftis, H. (2007). Proteinase-activated receptor-2 promotes allergic sensitization to an inhaled antigen through a TNF-mediated pathway *The Journal of Immunology*, 179 (5): 2910-17.

Eberlein, B., Leon Suarez, I., Darsow, U., Rueff, F., Behrendt, H. & Ring, J. (2010). A new basophil activation test using CD63 and CCR3 in allergy to antibiotics. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40 (3): 411-8.

Fajardo-Lira, C., Oria, M., Hayes, K. D. & Nielsen, S. S. (2000). Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. *Journal of Dairy Science*, 83 (10): 2190-9.

Faruqi, T. R., Weiss, E. J., Shapiro, M. J., Huang, W. & Coughlin, S. R. (2000). Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (26): 19728-34.

Fyfe, M., Bergström, M., Aspögren, S., Peterson, A. (2005). PAR-2 activation in intestinal epithelial cells potentiates interleukin-1 $\beta$ -induced chemokine secretion via MAP kinase signaling pathways. *Cytokine*, 31 (5): 358-67.

Galli, S. J. (2000). Mast cells and basophils. *Current Opinion in Hematology*, 7 (1): 32-9.

Ghaemmaghami, A. M., Gough, L., Sewell, H. F. & Shakib, F. (2002). The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. *Clinical and Experimental Allergy*, 32 (10): 1468-75.

Hida, S., Yamasaki, S., Sakamoto, Y., Takamoto, M., Obata, K., Takai, T., Karasuyama, H., Sugane, K., Saito, T. & Taki, S. (2008). Fc receptor gamma-chain, a constitutive component of the IL-3 receptor, is required for IL-3-induced IL-4 production in basophils. *Nature Immunology*, 10 (2): 214-22.

Howells, G. L., Macey, M. G., Chinni, C., Hou, L., Fox, M. T., Harriott, P. & Stone, S. R. (1997). Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *Journal of Cell Science*, 110: 881-7.

Hung, D. T., Wong, Y. H., Vu, T. H. & Coughlin, S. R. (1992). The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenyl cyclase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 267 (29): 20831-4.

Iwasaki, H., Mizuno, S., Arinobu, Y., Ozawa, H., Mori, Y., Shigematsu, H., Takatsu, K., Tenen, D. G. & Akashi, K. (2006). The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes & development*, 20 (21): 3010-21.

Iwasaki, H. & Akashi, K. (2007). Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, 26 (6): 726-40.

- Kelly, A. L., O'Flaherty, F. & Fox, P. F. (2006). Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. *International Dairy Journal* 16: 563-572.
- Kim, S., Prout, M., Ramshaw, H., Lopez, A. F., LeGros, G. & Min, B. (2010). Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *Journal of immunology*, 184 (3): 1143-7.
- Kishi, K. (1985). A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. *Leukemia Research*, 9 (3): 381-90.
- Knol, E., Mulh, F., Jansen, H., Calafat, J. & Roos, D. (1991). Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88: 328-38.
- Kong, W., McConalogue, K., Khitin, L. M., Hollenberg, M. D., Payan, D. G., Böhm, S. K. & Bunnnett, N. W. (1997). Luminal trypsin may regulate enterocytes through proteinase-activated receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (16): 8884-9.
- Kouzaki, H., O'Grady, S. M., Lawrence, C. B. & Kita, H. (2009). Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *Journal of immunology*, 183 (2): 1427-34.
- Kroeger, K. M., Sullivan, B. M. & Locksley, R. M. (2009). IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38alpha-dependent pathway. *Journal of leukocyte biology*, 86 (4): 769-78.
- Lantz, C. S., Boesiger, J., Ho Song, C., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R. C., Nawa, Y., Dranoff, G. & Galli, S. J. (1998). Role of interleukin-3 in mast-cell and basophil development and immunity to parasites. *Nature*, 392: 90-3.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker*. 3 utg. Oslo: Fagbokforlaget.
- Lerner, D. J., Chen, M., Tram, T. & Coughlin, S. R. (1996). Agonist Recognition by Proteinase-activated Receptor 2 and Thrombin receptor. *The journal of Biological Chemistry*, 271 (24): 13943-7.
- MacGlashan, D., Jr. (2010). Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40 (9): 1365-77.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. (2009). *Brock biology of microorganisms*. 12 utg. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Miike, S., McWilliam, A. S. & Kita, H. (2001). Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *The Journal of Immunology*, 167: 6615-22.

- Molino, M., Barnathan, E. S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashit, A., Hoxie, J. A., Schechter, N., Woolkalis, M. & Brass, L. F. (1997). Interactions of mast cell tryptase with trombin receptors and PAR-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (7): 4043-49.
- Nielsen, S. S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (22): 6628-34.
- Novey, H. S., Marchioli, L. E., Sokol, W. N. & Wells, I. D. (1979). Papain-induced asthma-physiological and immunological features. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 63 (2): 98-103.
- Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C. & Sundelin, J. (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 9208-212.
- Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A. K., Strömbeck, B. & Sundelin, J. (1995). Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *European Journal of Biochemistry*, 232 (1): 84-9.
- Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K. & Scultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxan A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (2): 504-8.
- Ohmori, K., Luo, Y., Jia, Y., Nishida, J., Wang, Z., Bunting, K. D., Wang, D. & Huang, H. (2009). IL-3 induces basophil expansion in vivo by directing granulocyte-monocyte progenitors to differentiate into basophil lineage-restricted progenitors in the bone marrow and by increasing the number of basophil/mast cell progenitors in the spleen. *Journal of immunology*, 182 (5): 2835-41.
- Ohshima, Y., Yang, L. P., Uchiyama, T., Tanaka, Y., Baum, P., Sergerie, M., Hermann, P. & Delespesse, G. (1998). OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4+T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood*, 92: 3338-45.
- Ostrowska, E. & Reiser, G. (2008). Protease-activated receptor (PAR)-induced interleukin-8 production in epithelial cells requires activation of MAP kinases p44/42 and JNK. *Biochemical and biophysical research communications*, 366 (4): 1030-5.
- Page, K., Strunk, V. S. & Hershenson, M. B. (2003). Crockroach proteases increase IL-8 expression in human bronchial epithelia cells via activation of protease-activated receptor (PAR)-2 and extracellular-signal-regulated kinase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112 (6): 1112-8.

- Page, K., Ledford, J. R., Zhou, P., Dienger, K. & Wills-Karp, M. (2010). Mucosal sensitization to German cockroach involves protease-activated receptor-2. *Respiratory research*, 11: 62.
- Paul, W. E. & Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology*, 10 (4): 225-35.
- Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S. A., Kaempfer, S., Spiegl, N. & Dahinden, C. A. (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*, 113 (7): 1526-34.
- Pendurthi, U. R. (2002). Plasmin Induces Cyr61 Gene Expression in Fibroblasts Via Protease-Activated Receptor-1 and p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Signaling Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22 (9): 1421-1426.
- Perrigoue, J. G., Saenz, S. A., Siracusa, M. C., Allenspach, E. J., Taylor, B. C., Giacomin, P. R., Nair, M. G., Du, Y., Zaph, C., van Rooijen, N., et al. (2009). MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nature immunology*, 10 (7): 697-705.
- Phillips, C. (2003). Basophils express a type 2 cytokine profile on exposure to proteases from helminths and house dust mites. *Journal of Leukocyte Biology*, 73 (1): 165-171.
- Politits, I., Barbano, D. M. & Gorewit, R. C. (1992). Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 75 (6): 1402-10.
- Prado, B., Sombers, S., Ismail, B. & Hayes, K. (2006). Effect of heat treatment on the activity of inhibitors of plasmin and plasminogen activators in milk. *International Dairy Journal*, 16 (6): 593-99.
- Quinton, T. M., Kim, S., Derian, C. K., Jin, J. & Kunapuli, S. P. (2004). Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor-4. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (18).
- Reischl, G., Corvaia, N., Effenberger, F., Woeffl-Winiski, B., Krömer, E. & Mudde, G. C. (2006). Function and regulation of FcεRI expression on monocytes from non-atopic donors. *Clinical & Experimental Allergy*, 26 (6): 630-41.
- Riedl, M. A., Landaw, E. M., Saxon, A. & Diaz-Sanchez, D. (2005). Initial High-Dose Nasal Allergen Exposure Prevents Allergic Sensitization to a Neoantigen. *The Journal of Immunology*, 174 (11): 7440-5.
- Roth-Walter, F., Berin, M. C., Arnaboldi, P., Escalante, C. R., Dahan, S., Rauch, J., Jensen-Jarolim, E. & Mayer, L. (2008). Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy*, 63 (7): 882-90.

- Sabri, A. (2002). Protease-Activated Receptor-1-Mediated DNA Synthesis in Cardiac Fibroblast Is via Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Distinct PAR-1 Signaling Pathways in Cardiac Fibroblasts and Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 91 (6): 532-539.
- Sambrano, G. R., Huang, W., Faraqui, T., Mahrus, S., Craik, C. & Coughlin, S. R. (2000). Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (10): 6819-23.
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 113 (5): 805-19; quiz 820.
- Schaller, J., Moser, P. W., Danneegger-Müller, G. A. K., Rösselet, S. J., Kämpfer, U. & Rickli, E. E. (1985). Complete amino acid sequence of bovine plasminogen. Comparison with human plasminogen. *European Journal of Chemistry*, 149 (2): 267-78.
- Schmidlin, F., Amadesi, S., Dabbagh, K., Lewis, D. E., Knott, P., Bunnett, N. W., Gater, P. R., Geppetti, P., Bertrand, C. & Stevens, M. E. (2002). Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *The Journal of Immunology*, 169 (9): 5315-21.
- Shen, T., Kim, S., Do, J. S., Wang, L., Lantz, C., Urban, J. F., Le Gros, G. & Min, B. (2008). T cell-derived IL-3 plays key role in parasite infection-induced basophil production but is dispensable for in vivo basophil survival. *International immunology*, 20 (9): 1201-9.
- Shpacovitch, V. M., Varga, G., Strey, A., Gunzer, M., Mooren, F., Buddenkotte, J., Vergnolle, N., Sommerhoff, C. P., Grabbe, S., Gerke, V., et al. (2004). Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *Journal of leukocyte biology*, 76 (2): 388-98.
- Siracusa, M. C., Saenz, S. A., Hill, D. A., Kim, B. S., Headley, M. B., Doering, T. A., Wherry, E. J., Jessup, H. K., Siegel, L. A., Kambayashi, T., et al. (2011). TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature*.
- Sokol, C. L., Chu, N. Q., Yu, S., Nish, S. A., Laufer, T. M. & Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nature immunology*, 10 (7): 713-20.
- Sokol, C. L. & Medzhitov, R. (2010). Emerging functions of basophils in protective and allergic immune responses. *Mucosal immunology*, 3 (2): 129-37.
- Sokol, S. L., Barton, G. M., Farr, A. G. & Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced helper type 2 responses. *Nature immunology*, 9 (3): 310-18.
- Sun, G., Stacey, M. A., Schmidt, M., Mori, L. & Mattoli, S. (2001). Interaction of mite allergens Der P3 and Der P9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 167: 1014-21.

- Temkin, V., Kantor, B., Meg, V., Hartman, M. L. & Levi Schaffer, F. (2002). Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *The Journal of Immunology*, 169 (5): 2662-69.
- Valent, P., Besemer, J., Kishi, K., Kaltenbrunner, R., Kuhn, B., Maurer, D., Lechner, K. & Bettelheim, P. (1990). IL-3 promotes basophilic differentiation of KU812 cells through high affinity binding sites. *The Journal of Immunology*, 145 (6): 1885-9.
- Vergnolle, N., Derian, C. K., D'Andrea, M. R., Steinhoff, M. & Andrade-Gordon, P. (2002). Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *The Journal of Immunology*, 169: 1467-73.
- Vu, T. K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64 (6): 1057-68.
- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Tovev, E. R., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., Stewart, G. A., Taylor, G. W., Garrod, D. R., Cannell, M. B., et al. (1999). Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *The Journal of Clinical Investigation*, 104 (1): 123-33.
- Wang, H., Moreau, F., Hirota, C. L. & MacNaughton, W. L. (2010). Proteinase-activated receptors induce interleukin-8 expression by intestinal epithelial cells through Erk/Rsk90 activation and histone acetylation. *The FASEB Journal*, 24 (6): 1971-80.
- Yamaguchi, A., Gabazza, E. C., Takei, Y., Yano, Y., Fujimoto, H., D'Alessandro-Gabazza, C. N., Murakami, E., Kobayashi, T., Takagi, T., Maruyama, J., et al. (2008). Role of thrombin in interleukin-5 expression from basophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368 (1): 116-20.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T. H., et al. (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *The Journal of Immunology*, 174: 8183-8190.
- Yoshimoto, T., Yasuda, K., Tanaka, H., Nakahira, M., Imai, Y., Fujimori, Y. & Nakanishi, K. (2009). Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nature immunology*, 10 (7): 706-12.