

Aus der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie –
Pferdezentrum Bad Saarow
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die Analyse der karzinoembryonalen Antigen- und
schwangerschaftsspezifischen Glykoprotein-Genfamilie
des Pferdes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sophie Mißbach
Tierärztin aus Magdeburg

Berlin 2019
Journal-Nr.: 4073

**Aus der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie –
Pferdezentrum Bad Saarow
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Die Analyse der karzinoembryonalen Antigen- und
schwangerschaftsspezifischen Glykoprotein-Genfamilie des
Pferdes**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Sophie Mißbach
Tierärztin
aus Magdeburg**

**Berlin 2019
Journal-Nr.: 4073**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler
Zweiter Gutachter: PD Dr. Robert Kammerer
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses; carcinoembryonic antigen; gene expression; polymerase chain reaction;
diagnostic techniques

Tag der Promotion: 31.01.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-021-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meinen Großvater, Dieter Mißbach.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen	IV
Verzeichnis der Abbildungen	VI
Verzeichnis der Tabellen	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	2
1.2 Fragestellung	2
2. Literaturteil	3
2.1 Genfamilien	3
2.2 Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)	3
2.2.1 Strukturelle Gemeinsamkeit und Grundlage für die Mitgliedschaft in der IgSF	3
2.2.2 Der Ursprung der Immunglobulindomäne (Ig-Domäne)	4
2.2.3 Mitglieder der IgSF und ihre Unterschiede	5
2.2.4 Funktionen der IgSF-Mitglieder	5
2.3 Der erweiterte Leukozyten-Rezeptor-Komplex (LRC)	6
2.3.1 Der Leukozyten-Rezeptor-Komplex	6
2.3.2 Die Erweiterung des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes	7
2.4 Die CEA-Genfamilie	8
2.4.1 Geschichte der CEA-Genfamilie	8
2.4.2 Nomenklatur	10
2.4.3 Aufbau der CEA-Moleküle	11
2.4.4 Bekannte Funktionen der CEACAMs	11
2.4.5 Die Mitglieder der CEA-Genfamilie als Pathogenrezeptor – Ein Selektionsmerkmal?	12
2.4.6 Die PSG-Untergruppe	14
2.4.7 Bekannte Funktionen der PSGs	15
2.4.8 Die CEA-Genfamilie des Pferdes	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Geräte	17
3.1.2 Verbrauchsmaterial	18
3.1.3 Enzyme	18
3.1.4 Kits	19
3.1.5 Chemikalien	19
3.1.6 Antikörper	20
3.1.7 Primer	21
3.1.7.1 Primerpaare endogen (Tabelle 2)	21
3.1.7.2 Primerpaare full length (Tabelle 3)	22
3.1.7.3 Primerpaare für die TM-Domäne (Tabelle 4)	22
3.1.7.4 Primerpaare für die Klonierung (Tabelle 5)	23
3.1.7.5 Primerpaare zur Sequenzierung der Vektoren (Tabelle 6)	23
3.1.8 Puffer und Lösungen	23
3.1.9 Gewebeproben vom Pferd zur Analyse der CEACAM-Expression	26
3.2 Methoden	28
3.2.1 Zellbiologische Methoden	28
3.2.1.1 Verwendete Zelllinie	28
3.2.1.2 Zellkultur	28
3.2.1.3 Isolierung von peripheren mononuklearen Zellen (PBMC) aus heparinisiertem Vollblut	28
3.2.1.4 Aktivierung der Lymphozyten mit Interleukin 2	29
3.2.1.5 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell-sorting = FACS)	29
3.2.1.6 Magnetische Zellseparation	30

3.2.2	Molekularbiologische Methoden	31
3.2.2.1	DNA-Extraktion aus Zellen in Suspension (mit QIAmp DNA Mini Kit von QIAGEN)	31
3.2.2.2	RNA-Isolation aus Zellkultur und Gewebe	31
3.2.2.3	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	33
3.2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	34
3.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.2.6	DNA-Gelextraktion (mit QIAquick Gel Extraktion Kits)	37
3.2.2.7	Klonierung mit dem PCR Cloning Kit™ von StrataClone	37
3.2.2.8	Miniprep (mit QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN)	38
3.2.2.9	Midiprep (NucleoBond Xtra Midi Plus Kit von Macherey-Nagel)	39
3.2.2.10	Sequenzierung	40
3.2.2.11	Transformation ohne Kit	41
3.2.2.12	Präparativer Restriktionsverdau vom Plasmid und Insert	41
3.2.2.13	Ligation	42
3.2.2.14	Transformation	43
3.2.2.15	Analytischer Restriktionsverdau	43
3.2.3	Statistische Methoden	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Die konservierten Mitglieder der CEA Genfamilie	44
4.1.1	CEACAM16	44
4.1.2	CEACAM19	45
4.2	CEACAM1 und CEACAM1-verwandte Gene	46
4.2.1	CEACAM1 und CEACAM43	47
4.3	CEACAM1-verwandte Mitglieder mit Exonen die für eine Transmembrandomäne kodieren	48
4.3.1	CEACAM1-verwandte Mitglieder mit einer Transmembrandomäne ohne zytoplasmatische Domäne	50
4.3.1.1	CEACAM53	50
4.3.2	Mitglieder mit einer Transmembrandomäne und zytoplasmatischen Exonen die für ein ITIM kodieren	52
4.3.2.1	CEACAM42	52
4.3.2.2	CEACAM45	54
4.3.2.3	CEACAM50	55
4.3.2.4	CEACAM54	57
4.3.3	Mitglieder mit einer Transmembrandomäne und zytoplasmatischen Exonen die für ein ITAM kodieren	61
4.3.3.1	CEACAM41	61
4.4	Sezernierte Mitglieder der equinen CEA-Familie	63
4.4.1	Bereits bekannte sezernierte Genfamilien Mitglieder	64
4.4.2	Die fehlenden, sezernierten CEACAM44, CEACAM52 und CEACAM56 ..	65
4.5	Expression der CEACAMs von PBMC und aktivierten PBMC	66
4.5.1	Charakterisierung der Lymphozytenkulturen	66
4.5.2	Extraktion der T-Zellen aus der PBMC-Kultur und Analyse der Subpopulationen	69
4.5.3	Sauberkeit der PBMC-Aufreinigung	71
4.6	Expression der CEACAMs in Lymphozytenpopulationen	72
4.6.1	Sezernierte, PSG-ähnliche CEACAMs	72
4.6.2	Membranverankerte CEACAMs in der Lymphozytenkultur	74
4.6.3	Expression der beschriebenen Mitglieder der CEA-Genfamilie auf Granulozyten und Endometrial Cups	75
5	Diskussion	77
5.1	Eingesetzte Methoden	77
5.1.1	Gewebeproben für die Expressionsstudien	77
5.1.2	Einsatz der Two-Step-RT-PCR	77

5.2	Die Lymphozyten Mischkultur von aus Vollblut isolierten PBMCs	77
5.2.1	Kultivierung der equinen Lymphozyten	77
5.2.2	Zusammensetzung der PBMC-Mischkultur des Pferdes	78
5.2.3	FACS-Analyse der Lymphozyten-Mischkultur	79
5.3	Auftreten der verschiedenen Spleißvarianten in der CEA-Genfamilie des Pferdes	80
5.3.1	Die equinen Spleißvarianten von CEACAM1	81
5.3.2	Spleißvarianten der membranverankerten equinen Mitglieder der CEA- Genfamilie	81
5.3.3	Spleißvarianten der sezernierten equinen Mitglieder der CEA-Genfamilie	81
5.4	Konservierte Mitglieder der CEA-Genfamilie	82
5.4.1	Die Spleißvariante und das Expressionsmuster von CEACAM19	82
5.4.2	Die Expression von CEACAM 16	83
5.5	Mitglieder der CEA-Genfamilie, die beim Pferd nur genomisch nachgewiesen wurden	83
5.5.1	Equine, sezernierbare Mitglieder der CEA-Genfamilie, die genomisch bestätigt wurden	83
5.6	Unterschiede zu bereits vorliegenden Ergebnissen für die Expression von equinen CEACAMs.....	84
5.7	Die Expression der nachgewiesenen löslichen CEACAMs (PSGs) im Pferd	84
5.7.1	Expressionsmuster der Endometrial Cups	85
5.7.2	Expression auf Immunzellen	85
5.8	Funktionen sezernierter, equiner CEACAMs über die feto-maternale Kommunikation hinaus	86
5.9	Lösliche CEACAM-Mitglieder, die sowohl bei den Endometrial Cups, als auch bei der PBMC-Mischkultur nachgewiesen wurden – Hinweis auf eine lymphozytäre Verunreinigung der Gewebeproben?	87
5.10	Verlust der durch Genomanalysen vorhergesagten inhibitorischen oder aktivierenden Signalmotive (ITIM/ITAM) beim Pferd.....	88
6	Zusammenfassung	89
6.1	Ausblick	90
7	Summary	91
7.1	Outlook.....	92
8	Quellen	93
9	Publikationsverzeichnis	101
9.1	Originalarbeiten.....	101
9.2	Kongressbeiträge (¹ Vorträge, ² Poster).....	101
9.3	Veröffentlichung von Datensätzen.....	102
10	Danksagung	103
11	Selbstständigkeitserklärung	104

Verzeichnis der Abkürzungen

ATV	Alsever's Trypsin-Versen-Lösung
BGP	Biliary Glycoprotein
CD	Cluster of differentiation
CEA	Karzioembryonales Antigen
CEACAM	Karzioembryonalem Antigen-verwandtes Zelladhäsionsmolekül
ConA	Concavalin A
DAP	Death-associated protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum (f etal c alf s erum)
Fc α R	Immunoglobulin- α -Fc-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPVI	Glycoprotein VI
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig-C	Konstante Immunglobulindomäne
Ig-Domäne	Immunglobulindomäne
IgG	Immunoglobulin G
Ig-V	Variable Immunglobulindomäne
IgSF	Immunoglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
ILCs	Innate lymphoid cells
ILT	Immunoglobulin-like transcripts
ITAM	Aktivierendes Tyrosin-basiertes Motiv
ITIM	Inhibierendes Tyrosin-basiertes Motiv
KIR	Killer Cell Immunoglobulin-like receptor
LAIR	Leukocyte-associated Ig-like receptor
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
LILR	Leukocyte immunoglobulin-like receptors
LPS	Lipopolysaccharid
LRC	Leukozyten-Rezeptor-Komplex
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCS	Multiple Cloning Site
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MHV	Mouse hepatitis virus
mRNA	Messenger RNA

NCA	Nonspecific cross-reacting antigen
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NCR	Natural cytotoxicity receptors
NKG2D	The Natural Killer Group 2D
NGS	Next generation sequencing
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
N-terminus	Amino-Terminus
PIR	Paired Immunoglobulin-like receptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
Psg	Schwangerschaftsspezifisches Glykoprotein
PWM	Pokeweed-Mitogen
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SIGLEC	Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAM	Tamoxifen
TGF- β	Transforming growth factor
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Der Aufbau einer Immunglobulin-Domäne am Beispiel der V-Domäne (modifiziert nach Barclay, 2003)
- Abbildung 2** Genetische Anordnung des humanen Leukozyten-Rezeptor-Komplexes im Vergleich zu dem der Maus (modifiziert nach Hsu *et al*, 2002)
- Abbildung 3** Struktur des erweiterten Leukozyten-Rezeptor-Komplexes. (modifiziert nach Barrow *et al*, 2008)
- Abbildung 4** Lokalisation des CEACAM/PSG-Clusters auf dem humanen Chromosom 19 (Kammerer, unveröffentlicht)
- Abbildung 5** Die Ausprägung der CEA-Genfamilie in unterschiedlichen Säugetierspezies (modifiziert nach Kammerer & Zimmermann, 2010)
- Abbildung 6** Stammbaum und Verwandtschaftsgrad der CEA-Genfamilie (modifiziert nach Pavlopoulou *et al*, 2014; Kammerer & Zimmermann, 2010)
- Abbildung 7** Die membranverankerten Mitglieder der humanen CEACAMs der CEA-Genfamilie (modifiziert nach Tchoupa *et al*, 2014)
- Abbildung 8** Signalkaskade ausgelöst durch die Bindung von Pathogenen an den CEACAM3-Rezeptor auf Granulozyten (modifiziert nach Gray-Owen *et al*, 2006)
- Abbildung 9** Aufreinigung der Vollblutproben mittels Dichtegradientenzentrifugation.
- Abbildung 10** Funktionsweise der Klonierung mittels dem StrataClone Cloning Kit (Quelle: StrataClone PCR Cloning Kit- INSTRUCTION MANUAL; Catalog #240205; Revision B.02).
- Abbildung 11** Für die Expressionsstudien eingesetzte, kommerzielle Vektoren. (Quelle Vektorkarten: snappene.com)
- Abbildung 12** Nachweis des CEACAM16 Gens und dessen Expression im Pferd.
- Abbildung 13** Detektion und Struktur vom equinen CEACAM19
- Abbildung 14** Exonstruktur der membranverankerten equinen CEA-Genfamilien Mitglieder auf Genomebene (Aleksic *et al*, 2016)
- Abbildung 15** Die Exonstruktur von CEACAM1 und seinen Spleißvarianten und seinem verwandten Gen CEACAM43
- Abbildung 16** Expression und Struktur des membrangebundenen CEACAM53
- Abbildung 17** Nachgewiesene Aminosäureaustausche (SNPs) nach Sequenzierung im Vergleich zur Vorhersage
- Abbildung 18** Vergleich der vorhergesagten Sequenz mit den beiden Sequenzen aus Vulva und Ösophagus
- Abbildung 19** Expression und Struktur des membranverankerten CEACAM42
- Abbildung 20** Expression, Struktur und nachgewiesene Spleißvarianten des membranverankerten CEACAM45
- Abbildung 21** Expression und Struktur des membranverankerten CEACAM50
- Abbildung 22** FACS-Analyse der Expression des Fusionsproteins FLAG-CEACAM50 in COS-7 Zellen
- Abbildung 23** Expression und Struktur der Spleißvarianten von CEACAM54 in den Gewebeproben vom Pferd

- Abbildung 24** FACS-Analyse der Expression vom Fusionsprotein FLAG-CEACAM54
- Abbildung 25** CEACAM54-RT-PCR mit Primern für ein potentielles Poly-A-Signal nach der Transmembrandomäne
- Abbildung 26** Expression, Struktur und nachgewiesene Spleißvarianten von CEACAM41 im Pferd
- Abbildung 27** EGFP-Expression nach Transfektion des Fusionsproteins CEACAM41-EGFP in COS-7 Zellen im Vergleich zu einer Negativkontrolle
- Abbildung 28** Vorhergesagte Exonstruktur der sezernierbaren CEACAM1 Paraloge im Pferd (Aleksic *et al*, 2016)
- Abbildung 29** Bisherige Ergebnisse für die sezernierten CEA-Genfamilien Mitglieder (PSGs) des Pferdes (Aleksic *et al*, 2016)
- Abbildung 30** Struktur des CEACAMs 44, CEACAM52 und CEACAM56 nach Sequenzierung der genomischen Banden
- Abbildung 31** FACS Ergebnisse von frisch isolierten PBMC – Die Streuung bei verschiedenen Tieren bzw. Proben
- Abbildung 32** FACS Analysen der kultivierten PBMCs mit rhIL-2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten
- Abbildung 33** FACS-Analyse der MACS separierten CD4+ T-Lymphozyten
- Abbildung 34** FACS-Analyse der MACS separierten CD8+ T-Lymphozyten
- Abbildung 35** FACS-Analysen der MACS-Separation der Lymphozyten nach einfacher und doppelter Aufreinigung
- Abbildung 36** Expression sezernierter, PSG-ähnlicher CEACAMs in der Lymphozytenkultur
- Abbildung 37** Nachgewiesene Spleißvarianten von CEACAM46 in den isolierten und aktivierten PBMCs
- Abbildung 38** Expression von membranverankerten CEACAM in den isolierten Lymphozyten
- Abbildung 39** Expression ausgewählter Mitglieder der CEA-Genfamilie auf Endometrial Cups und Granulozyten
- Abbildung 40** Mögliche Funktion der sezernierten Mitglieder der CEA-Genfamilie im Immunsystem

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Vergleich der Expression der 6 häufigsten Gengruppen im Menschen zu verschiedenen Wirbellosen (modifiziert nach Barclay, 2003)
Tabelle 2	Primerpaare endogen
Tabelle 3	Primerpaare full length
Tabelle 4	Primerpaare für die TM-Domäne
Tabelle 5	Primerpaare für die Klonierung
Tabelle 6	Primerpaare zur Sequenzierung der Vektoren
Tabelle 7	Pipettierschema Mix1, RT-PCR
Tabelle 8	Pipettierschema Mix 2, RT-PCR
Tabelle 9	GAPDH-PCR mit Taq-Polymerase (Quelle: Pipettierschema von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase für 25 µl)
Tabelle 10	PCR-Cycler Programmierung für Taq-Polymerase (Quelle: Cycler-Protokoll von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase)
Tabelle 11	PCR-Ansatz Taq-Polymerase (Quelle: Pipettierschema von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase für 25 µl)
Tabelle 12	PCR-Ansatz EasyA-Polymerase (Quelle: Pipettierschema von Agilent für EasyA Polymerase für 25 µl)
Tabelle 13	PCR-Cycler Programmierung für Taq-Polymerase (Quelle: Cycler-Protokoll von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase)
Tabelle 14	PCR-Cycler Programm für EasyA-Polymerase (Quelle: Cycler-Protokoll von Agilent für EasyA Polymerase)
Tabelle 15	Ansatz Ligation, StrataClone PCR Cloning Kit
Tabelle 16	Protokoll Sequenz-PCR (Quelle: Applied Biosystems; leicht abgewandelt von AG Meyers (Kooperierende Arbeitsgruppe))
Tabelle 17	Cycler Programm für die Sequenzierungs-PCR (Quelle: Applied Biosystems, leicht abgewandelt von AG Meyers (Kooperierende Arbeitsgruppe))
Tabelle 18	Pipettierschema für den Restriktionsverdau (Quelle: Thermo Scientific)
Tabelle 19	Pipettierschema für die Ligation mit der T4 Ligase (Quelle: Thermo Scientific)
Tabelle 20	Expressionsmuster und Intensität der bereits untersuchten membranverankerten Mitglieder der CEA-Genfamilie (Aleksic, D. 2010)
Tabelle 21	Zusammensetzung der PBMC-Mischkultur zu den unterschiedlichen Aktivierungszeitpunkten
Tabelle 22	Vergleichswerte für die Zusammensetzung der equinen PBMC-Kultur aus der Literatur

1. Einleitung

Die CEA-Genfamilie bildet eine Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie. Ihre einzelnen Mitglieder sind in mehr oder minder großer Anzahl von den Knorpelfischen bis hin zu den höher entwickelten Säugetieren zu finden, sie fehlen jedoch vollständig in den Vögeln (Chang *et al*, 2013). Die Familie setzt sich aus konservierten Mitgliedern, die in nahezu allen Säugerspezies zu finden sind, und aus CEACAM1 und dessen paralogen Genen zusammen (Barnett *et al*, 1993; Kammerer, R. & Zimmermann, W., 2010). Es lassen sich drei verschiedene Gruppen der Mitglieder der CEA-Genfamilie ausmachen, die membranverankerten CEACAMs, die an ihrem zytoplasmatischen Anteil ein tyrosin-basiertes Signalmotiv in Form eines ITIM oder ITAM tragen können. Speziesabhängig kann diese Verankerung auch in Form eines GPI-Ankers ausgebildet sein (Hammarström, 1999). Die zweite Gruppe bilden die sezernierten schwangerschaftsspezifischen Glykoproteine (PSGs), die vor allem von der Plazenta gebildet werden und nur in Spezies mit einer hämochorialen Plazenta gefunden wurden (Kammerer, R. & Zimmermann, W., 2010). In der dritten Gruppe siedeln sich die sogenannten Pseudogene an, die funktionell keine Bedeutung haben, allerdings aufzeigen, dass die CEA-Genfamilie evolutionär eine noch sehr junge Familie darstellt (Beauchemin *et al*, 1999).

Den Ursprung dieser Familie bildete die Entdeckung des CEA-Antigens als Tumormarker für Kolonkarzinome durch Gold und Freedman und die Gruppe um von Kleist in den 60er Jahren (Gold & Freedman, 1965; von Kleist & Burtin, 1969). Damals wurde noch angenommen, dass dieses Antigen während der Embryonalentwicklung und später ausschließlich in tumorös entartetem Gewebe im adulten Organismus exprimiert wird. Allerdings führten Signale in Proben klinisch gesunder Menschen zu einer genaueren Analyse dieses Sachverhalts und der Erkenntnis, dass es sich nicht nur um ein Antigen, sondern um eine vielfältige Familie von Antigenen handelt, die auch physiologisch in gesundem Gewebe unterschiedlichster Art exprimiert werden (Pusztaszeri & Mach, 1973).

Bis heute sind nur wenige der Spezies, in denen Hinweise auf das Vorhandensein der CEA-Genfamilie existieren, genauer untersucht (Kammerer & Zimmermann, 2010). Genauer untersucht sind die CEA-Familien von Mensch, Maus und Ratte. Auch für einige Affenspezies gibt es schon genauere Analysen (Beauchemin *et al*, 1999; Zhou & Hammarström, 2001). Von unseren Haussäugetieren ist nur der Hund mit seiner Ausprägung der CEA-Genfamilie publiziert und auch für das Rind und das Schwein gibt es schon einzelne Untersuchungen (Kammerer *et al*, 2004; Kammerer *et al*, 2007). Doch einzig im Pferd als epithelochorialem Plazentatier lassen sich Sequenzen sezernierter Mitglieder der CEA-Genfamilie finden, weshalb es im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden soll.

1.1 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die CEA-Genfamilie des Pferdes vollständig analysiert werden, wobei der Schwerpunkt auf den membranverankerten Mitgliedern liegt, da in der Arbeitsgruppe Kammerer bereits eine Untersuchung der sezernierten Mitglieder im Rahmen einer Bachelorarbeit von Denis Aleksic 2010 durchgeführt wurde. Aufbauend auf diesen Ergebnissen soll die CEA-Genfamilie des Pferdes für alle Mitglieder komplettiert werden.

1.2 Fragestellung

- Wie stellen sich die vorhergesagten, membranverankerten CEA-Genfamilien Mitglieder im Pferd dar? Gibt es neben den vorhergesagten noch weitere Mitglieder dieser Genfamilie? Können nicht exprimierte CEA-Genfamilien Mitglieder im Genom des Pferdes nachgewiesen werden?
- Werden von den gefundenen CEACAMs verschiedene Spleißvarianten exprimiert?
- Können von jedem nachgewiesenen Mitglied Expressionsvektoren für zukünftige funktionelle Untersuchungen generiert werden?
- Werden die vom Pferd bekannten ITIM/ITAM-Motive wirklich exprimiert?!
- Werden Mitglieder der CEA-Genfamilie des Pferdes, wie in anderen Spezies auch, auf Immunzellen exprimiert? Welche Mitglieder der CEA-Genfamilie sind das?

2. Literaturteil

2.1 Genfamilien

Dank moderner molekularbiologischer Methoden, wie des „Next generation sequencing (NGS)“, konnte die Struktur der kodierenden Anteile im Genom aufgedeckt werden. Viele Bereiche sind in sogenannten Genfamilien und -Superfamilien organisiert, wobei eine Genfamilie eine Übereinstimmung von über 50% auf Aminosäureebene besitzt, die der Superfamilien liegt darunter (Thornton & DeSalle, 2000). Eine Genfamilie beschreibt eine Gruppe von Genen (sogenannten Homologen), die sich über ihren Aufbau und ihre Struktur auf einen genetischen Vorfahr zurückführen lassen. Auf Grund dieser Ähnlichkeit haben sie auch oft vergleichbare Funktionen im Organismus. Genfamilien sind meist speziesübergreifend im Genom erhalten, unterscheiden sich allerdings aufgrund spezies-spezifischer Duplikationen oder Genverlusten (Demuth *et al*, 2006). Es gibt nach Fitch, 1970 zwei verschiedene Arten von homologen Genen innerhalb von Genfamilien: zum einen existieren die Paralogen, die auf die Duplikation des Gens innerhalb eines Genoms zurückzuführen sind und zum anderen die Orthologen, die auf Grund der Entwicklung oder Entstehung der verschiedenen Spezies entstanden sind und somit in zwei oder mehr unterschiedlichen Genomen zu finden sind. Als die treibende Kraft der spezies-spezifischen Entwicklung von Genfamilien, wird Anpassung an bestimmte Umstände, seien sie pathogener oder metabolischer oder anderer Natur, vermutet (Lespinet *et al*, 2002). Es existiert beispielsweise ein Gen-Cluster, welches mit der Langlebigkeit einer Spezies in Verbindung gebracht wird. Die Genfamilien dieses Clusters sind involviert in Translation, Proteinmetabolismus oder auch Genexpression, alles Prozesse, die eine Lebensdauer des Organismus mitbestimmen. Nur in Spezies mit einer langen Lebensspanne fand die Duplikation dieses Clusters statt (Doherty *et al*, 2016). Andere Genfamilien übernehmen andere wichtige Funktionen im Organismus. So gibt es eine Superfamilie, die eine Immunglobulineinheit als gemeinsames Merkmal teilt, die Immunglobulin-Superfamilie. Wie der Name schon vermuten lässt, sind deren Mitglieder an verschiedenen Prozessen des Immunsystems beteiligt.

2.2 Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)

Bei der IgSF handelt es sich um eine der größten bekannten Genfamilien. Ihr Ursprung fällt vermutlich mit der Entwicklung der Protozoen zu den Metazoa während der Kambrischen Explosion vor rund 540 Millionen Jahren zusammen (Hood & Hunkapillar, 1991). Die einzelnen Untergruppen dieser Superfamilie und ihre jeweiligen Mitglieder sind weit über das gesamte Genom verteilt und auf unterschiedlichen Chromosomen zu finden (Williams & Barclay, 1988). Ihnen allen gemein ist eine Struktur, die als homologe Immunglobulin-Einheit, beziehungsweise Immunglobulin-Domäne, bezeichnet wird (Hunkapillar & Hood, 1986). Aus dem Familiennamen lässt sich auch das ursprüngliche Mitglied dieser Genfamilie ableiten, das Immunglobulin, auch bekannt als Antikörper (Natarajan *et al*, 2006). Neben ihrer Eigenschaft, als Oberflächenantigene zur Zellerkennung liegt den Mitgliedern dieser Genfamilie laut Williams & Barclay, 1988 eine Schlüsselfunktion der Immunität inne.

2.2.1 Strukturelle Gemeinsamkeit und Grundlage für die Mitgliedschaft in der IgSF

Die Grundstruktur der IgSF bildet eine oder mehrere sogenannte Ig-ähnliche Domänen. Die Bezeichnung kommt daher, dass Immunglobulindomänen ursprünglich bei den Antikörpern, also den Immunglobulinen entdeckt wurden. Eine solche Domäne hat immer den gleichen Grundaufbau. Sie besteht aus mehreren, individuellen, etwa 100 Aminosäure langen Ketten, die am Ende durch eine Disulfidbrücke stabilisiert werden. Diese wird von zwei 50-70 Aminosäuren auseinanderliegenden Cysteinresten gebildet (Natarajan *et al*, 2006). Die Tertiärstruktur wird als zweilagiges Sandwich bezeichnet, gebildet aus zwei β -Faltblättern mit insgesamt 7 antiparallelen β -Strängen, verbunden durch eine Disulfidbrücke (Abb. 1). Die dadurch gebildete räumliche Struktur wird als griechischer Schlüssel oder auch als Mäander-

Motiv bezeichnet (Natarajan *et al*, 2006; Williams & Barclay, 1988; Barclay, 2003), die Art der Faltung selbst nennt man auch Immunglobulinfaltung (Janeway Immunologie, 2014).

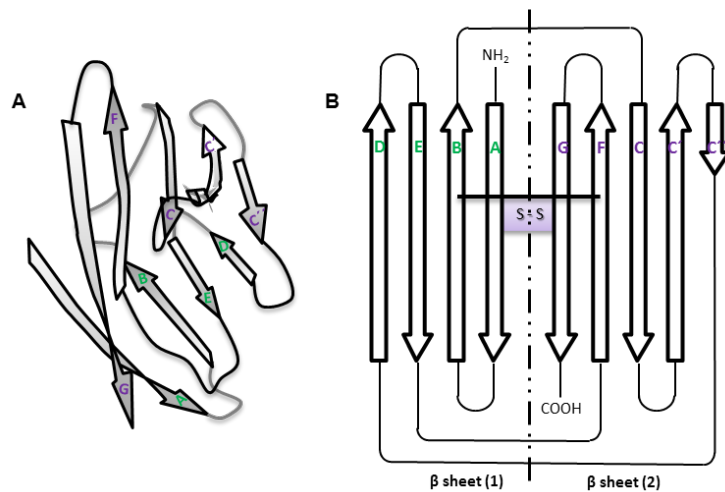


Abb. 1: Der Aufbau einer Immunglobulin-Domäne am Beispiel der V-Domäne (modifiziert nach Barclay, 2003): **A** Die 3D-Struktur einer typischen Ig-Domäne, aufgebaut aus zwei β -Faltblättern, mit den verschiedenen β -Strängen als breite Pfeile entlang ihrer Faltrichtung und den sie verbindenden Loops als dünne Linien dargestellt. Die Stränge der zwei verschiedenen β -Faltblätter sind durch grüne, bzw. violette Beschriftung voneinander abgegrenzt. **B** Die 2-dimensionale Darstellung der Anordnung der β -Faltblätter in der Ig-Domäne. Auch hier sind die einzelnen β -Stränge der zwei verschiedenen Falblätter durch die unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und durch breite Pfeile in ihre jeweilige Faltrichtung veranschaulicht. Die Loops sind wieder als dünnere Linien dargestellt.

Grundlegend können auf Grund von strukturellen Unterschieden bei den Immunglobulindomänen zwei Haupttypen unterschieden werden: die konstanten (C)Domänen und die variablen (V)Domänen. Der hauptsächliche Unterschied besteht in der Anzahl ihrer β -Stränge und im Abstand zwischen den einzelnen Cysteinen. Bei der konstanten Domäne ist das Faltmuster 4+3 Stränge und 55-60 Aminosäuren zwischen den Cysteinen. Dagegen besteht die variable Domäne aus 4+5 β -Strängen mit 65-75 Aminosäuren zwischen ihren Cysteinen, die beiden zusätzlichen β -Stränge sind etwas kürzer als der Rest und werden als C' und C'' bezeichnet, sie bilden eine zusätzliche Schleife, die im Immunglobulin die Bindungsstelle der Antikörper darstellt (Natarajan *et al*, 2006; Janeway Immunologie, 2014). Es gibt noch einen dritten Typ von Domäne, der als C2-Domäne bezeichnet wird. Abgeleitet von der Sequenz ist er eher den V-Domänen zuzuordnen, allerdings entspricht die Größe eher der einer kompakteren C-Domäne, was dazu führt, dass sie als „Unterart“ dieser geführt wird. Die originale C-Domäne wird dadurch auch als C1-Domäne bezeichnet und tritt fast ausschließlich in Immunglobulinen, MHC-Molekülen und im β -2-Mikroglobulin auf (Barclay, 2003; Natarajan *et al*, 2006).

2.2.2 Der Ursprung der Immunglobulindomäne (Ig-Domäne)

Sowohl beim Menschen, als auch bei anderen Säugetieren, ist die Ig-Domäne die wohl verbreitetste Struktur die im Genom kodiert ist. Doch auch in anderen Wirbeltieren bis hin zu den Wirbellosen, kann diese Domäne nachgewiesen werden (Barclay, 2003). Basierend auf dem Hidden Markov Model können ausgehend von den Aminosäuren, die für die Proteinfaltung dieser Domäne verantwortlich sind, über computerbasierte Suchen sowohl prokaryotische, als auch eukaryotische Mitglieder für die IgSF identifiziert werden (Natarajan *et al*, 2006). In den Eukaryoten lässt sich eine starke Expansion der Ig-Domäne von den Wirbellosen hin zu den Wirbeltieren beobachten, was wahrscheinlich mit der Entwicklung des adaptiven Immunsystems in Zusammenhang gebracht werden kann (Tabelle 1)(Barclay, 2003).

	Interpro ID	Human	Fly	Ciona	Nematode
Zn finger	IPR000822	878	354	126	243
IgSF	IPR003006	855	149	84	46
Eucaryotic protein kinase	IPR000719	659	250	199	493
Rhodopsin	IPR000276	543	81	72	394
Ser/Thr kinase	IPR002290	452	172	177	295
EGF	IPR000561	361	104	128	206
WD-40 repeats	IPR001680	352	181	144	168

Tabelle 1 (Zusammengestellt aus Daten von Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) und <http://www.sciencemag.org/cgi/data/298/5601/2157/dc1/1>): Vergleich der Expression der 6 häufigsten Gengruppen im Menschen zu verschiedenen Wirbellosen (nach Barclay, 2003): Auffällig und interessant ist der sprunghafte Anstieg der IgSF-Mitglieder in den Wirbeltieren, z. B. des Menschen, im Vergleich zu den drei dargestellten Wirbellosen. Auch bei den anderen Gengruppen exprimiert der Mensch stets mehr, als die Wirbellosen, jedoch ist der Unterschied nicht so extrem ausgeprägt.

In Bakterien findet man die Ig-Domäne vorrangig in Enzymen zum Abbau von Polysacchariden oder aber in Chaperonen. Auch in säugerspezifischen Viren sind der Ig-Domäne ähnliche Strukturen zu finden (Natarajan *et al.*, 2006). Was die ursprüngliche Funktion der Ig-Domäne war, lässt sich nur vermuten. Auch ob es ursprünglich Teil eines Membranproteins oder aber eines zytosolischen Proteins war ist unklar, da im Zytosol von Wirbellosen Ig-Domänen gefunden werden konnten (Barclay, 2003). Fraglich bleibt auch, ob der Ursprung in nur einem Urahnen liegt, was beispielsweise Hill und Kollegen für die Immunglobuline postulierte (Hill *et al.*, 1966), oder ob hier doch eine konvergente Evolution zu Grunde liegt. Doch auf Grund der rasanten evolutionären Divergenz dieser Gene, kann das nicht genau nachvollzogen werden (Barclay, 2003).

2.2.3 Mitglieder der IgSF und ihre Unterschiede

Es ist nur eine Ig-Domäne notwendig, um zu der Familie der Immunglobulinsuperfamilie zugeordnet zu werden. Eine Ig-Domäne besitzen, z. B. die γ - und δ -Untereinheit des CD3-Moleküls, CD7, Thy-1 oder aber auch das β -2-Mikroglobulin mit seiner C1-Domäne (Natarajan *et al.*, 2006). Andere Mitglieder haben mehrere Ig-Domänen oder sind gänzlich aus ihnen aufgebaut, wie beispielsweise CD2, KIR oder die Immunglobuline selbst. Auch die Mitglieder der CEA-Genfamilie sind gänzlich aus Ig-Domänen aufgebaut (Öbrink, 1997). Der Vertreter mit der meisten Anzahl an Ig-Domänen ist mit 17 Domänen Sialoadhesin auch bekannt als Siglec-1 (Barclay, 2003).

2.2.4 Funktionen der IgSF-Mitglieder

Auf Grund ihrer starken Variation im Aufbau können die Mitglieder der IgSF mannigfaltige Aufgaben im Organismus übernehmen. Allen gemein ist dabei der Aspekt, dass es sich immer um eine Zelladhäsion oder Zellbindung handelt, die eine anschließende Reaktion an der Zelloberfläche triggert. Dabei können sowohl homophile, als auch heterophile Bindungen auftreten, wobei die meisten Mitglieder wegen ihrer Membranverankerung an der Zelloberfläche wirken. Ausnahmen bilden dabei die Antikörper selbst, die erst nach Kopplung eines Antigens und anschließender Bindung an ein Effektormolekül eine Reaktion vermitteln (Williams & Barclay, 1988). Abgeleitet davon lassen sich drei große Übergruppen für die Funktionsweisen der IgSF-Mitglieder bilden: die Antigenerkennung, die Zelladhäsion und die Signaltransduktion (Natarajan *et al.*, 2006).

Die Rolle der Antigenerkennung und somit der Unterscheidung in körpereigenen und körperfremd übernehmen die von den B-Zellen produzierten und sezernierten Immunglobuline und die T-Zell-Rezeptoren, wobei die T-Zell Rezeptoren Antigene auf Zelloberflächen erkennen und binden, hingegen die sezernierten Immunglobuline lösliche Antigene binden (Hood *et al.*, 1985). Sowohl bei den T-Zell Rezeptoren, als auch bei den

Antikörpern lässt sich eine große Vielfalt ihrer Bindungsstelle anhand der großen strukturellen Variation der Immunglobulindomäne erkennen, was eine Grundlage des adaptiven Immunsystems darstellt. Diese Bindungsstelle wird von Immunglobulindomänen des V-Typs gebildet (Natarajan *et al*, 2006).

Die durch IgSF-Moleküle vermittelte Zelladhäsion hat auf vielen Ebenen im Organismus eine große Bedeutung. So spielt sie eine zentrale Rolle in der Fortbewegung und Migration von Leukozyten oder bei der T-Zell Aktivierung. Über die einfache Zelladhäsion hinaus kann auch intrazelluläre Signaltransduktion in Form einer Tyrosinphosphorylierung, einer Zytokinausschüttung oder eines Umbaus des Cytoskeletts stattfinden. Auf neuronaler Ebene, vermittelt durch Mitglieder der NCAMs, wird die Zelladhäsion für das axonale Wachstum benötigt. Ebenso ist die IgSF-vermittelte Zelladhäsion für die Innervierung von Muskeln und die neuronale Migration im Nervensystem wichtig (Natarajan *et al*, 2006).

2.3 Der erweiterte Leukozyten-Rezeptor-Komplex (LRC)

2.3.1 Der Leukozyten-Rezeptor-Komplex

Es existiert eine Vielzahl von Genen im menschlichen Genom, die für Mitglieder der IgSF kodieren (Barrow *et al*, 2008). Ein bedeutender Anteil entfällt im menschlichen Genom dabei auf den Chromosomenabschnitt 19q13.4. In diesem etwa 1 Mb-großen Bereich liegt der immunologisch bedeutsame Leukozyten-Rezeptor-Komplex, in dem ein Großteil der Oberflächenrezeptoren von Immunzellen verschlüsselt wird (Wilson *et al*, 2000). Auf diesem Chromosomenabschnitt befinden sich beispielsweise die Rezeptoren der Killerzellen (KIR), der myeloiden Zelllinien (LILR und LAIR) (Abb.2) mit dem MHC I als Hauptliganden (Barrow *et al*, 2008). Bei der Maus findet sich ein ähnlicher Komplex auf dem Chromosom 7, der auch Gene beherbergt, die als Liganden für MHC I fungieren und am ehesten mit den LILRs des Menschen zu vergleichen sind (Wilson *et al*, 2000; Hsu *et al*, 2002). Sie werden als PIRs, paired Ig-like receptors, bezeichnet (Abb.2).

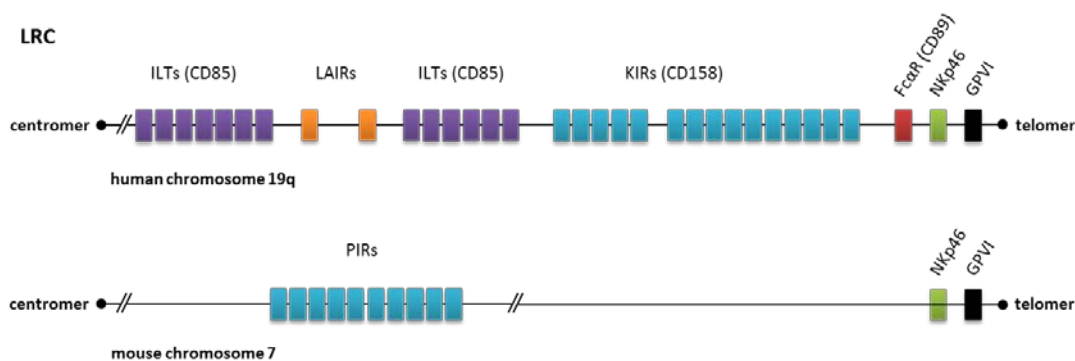


Abb.2: Genetische Anordnung des humanen Leukozyten-Rezeptor-Komplexes im Vergleich zu dem der Maus (modifiziert nach Hsu *et al*, 2002): Die Organisation der Gene des humanen Leukozyten-Rezeptor-Komplexes auf Chromosom 19 beginnt ausgehend vom Zentromer mit zwei Blöcken der LILRs (auch ILTs), unterbrochen durch die zwei bekannten LAIR-Gene, gefolgt von einer individuell differenzierenden Anzahl an KIRs. Den Abschluss des LRC bilden CD89, NKp46 und GPVI. Darunter gezeigt ist das Analogon der Maus auf Chromosom 7, welches einen deutlich geringeren Umfang besitzt und anstatt der LILRs, LAIRs und KIRS die PIRs besitzt, die am ehesten den LILRs entsprechen. Für die anderen Gene gibt es kein Gegenstück im Maus-LRC. Auch das CD89 fehlt bei der Maus.

Im LRC gibt es recht konservierte Bereiche, wie den der LILRs, die sich in ihrer Anzahl zwischen Individuen einer Spezies nicht stark unterscheiden (Wilson *et al*, 2000). Gemessen daran, sind die KIRs eine evolutionär deutlich jüngere Genfamilie, die auch in nahe verwandten Spezies, wie Mensch und Schimpanse starke Unterschiede aufweist und deren entsprechendes Gegenstück im Maus-LRC vergeblich gesucht wird (Wilson *et al*, 2000;

Khakoo *et al*, 2000). Diese Diversität wird von vielen auf die Anpassung an speziesspezifische Pathogene zurückgeführt (Wilson *et al*, 2000; Khakoo *et al*, 2000). Charakteristisches Merkmal vieler Gene des LRC ist, dass sie für Rezeptoren kodieren die entweder inhibitorische oder aktivierende Signale weiterleiten. Aktivierende Signale werden meist nicht direkt über den Rezeptor selbst vermittelt, sondern über ein sogenanntes Adapterprotein. Solche Adapterproteine, wie beispielsweise DAP12, finden sich in einem zentromerisch des LRC gelegenen Abschnitt. Eine weitere Besonderheit von diesen Rezeptoren ist, dass sie häufig paarig exprimiert werden. Das heißt, dass sowohl ein aktivierender, als auch ein inhibierender Rezeptor mit ähnlichem oder gar gleichem extrazellulären Anteil gleichzeitig auf einer Zelle zu finden sind (Barrow *et al*, 2008).

2.3.2 Die Erweiterung des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes

Den erweiterten Anteil des LRC findet man in Zentromer Richtung auf dem gleichen Chromosom wie den LRC selbst, beim Menschen im Bereich 19q13.1 bis 19q13.3 (Abb. 3). In diesem Bereich finden sich einzelne Gene oder auch Genfamilien, die einen gewissen Verwandtschaftsgrad oder eine andere Beziehung, beispielsweise als Adapterproteine, zu den Genen des LRC aufweisen (Barrow *et al*, 2008).

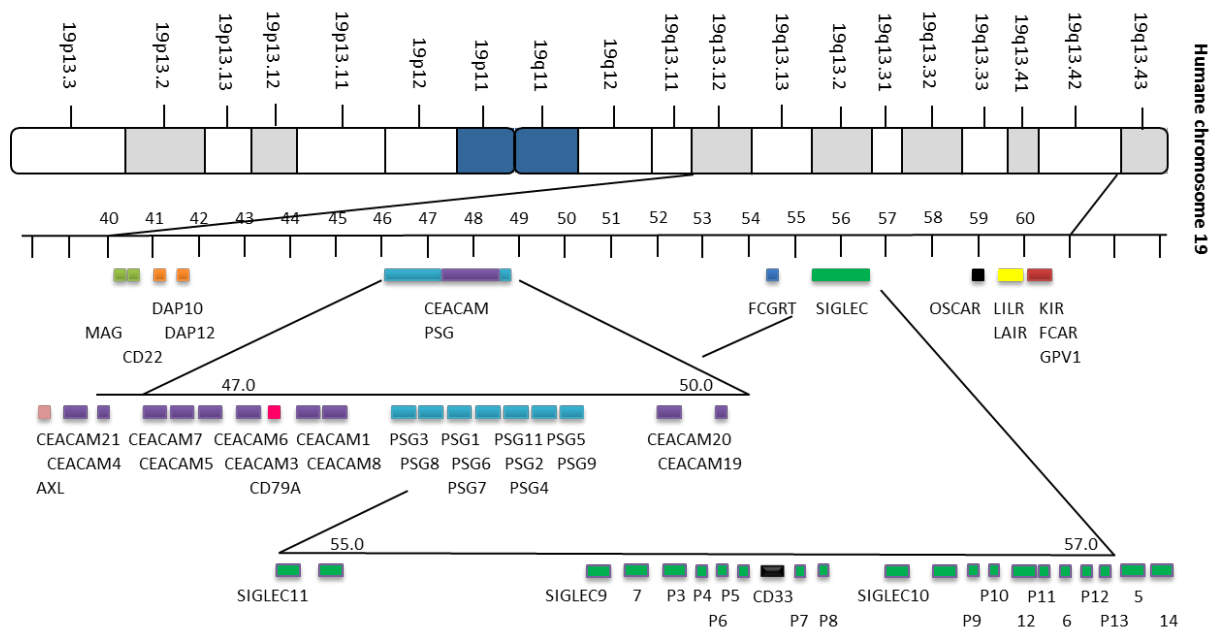


Abb. 3: Struktur des erweiterten Leukozyten-Rezeptor-Komplexes (modifiziert nach Barrow *et al*, 2008): Abgebildet ist der Abschnitt q13.12 bis q13.42 des humanen Chromosoms 19 in dem der erweiterte LRC zu finden ist. Ausgehend vom Zentromer finden sich zuerst die Gene des erweiterten Bereiches, wie die beiden DAPs (orange Quadrate), der blau/violett dargestellte CEACAM/PSG Cluster oder der grün dargestellte SIGLEC Cluster. Im Bereich 19q13.4 finden sich dann die Gene des eigentlichen LRC. Hier repräsentiert durch die gelb dargestellten LILRs und die rot dargestellten KIRs.

Zu den bekanntesten oder wichtigsten Genen in diesem Bereich gehören zum einen die Adapterproteine DAP10 und DAP12, wobei DAP12 beispielsweise ein wichtiges Adaptermolekül für die aktivierenden Mitglieder der KIR-Familie darstellt (Lanier, 2009). Zum anderen sind in diesem Bereich auch die Mitglieder der SIGLEC-Familie und auch der CEACAM/PSG-Familie. Beide sind vermutlich durch verschiedene Stadien der genomischen Duplikation entstanden (Barrow *et al*, 2008) und haben mit den Genen des LRC nur so viel gemein, dass auch sie immunregulatorische Funktionen ausüben. Neben diesen Familien oder Paaren von Genen, finden sich auch noch einzelne Rezeptoren, wie Axl, eine Proteintyrosinkinase der TAM-Rezeptoren und CD79 α , die eine Untereinheit des B-Zell-Rezeptorkomplexes ist, sowie der neonatale FcRezeptor, dessen Ligand IgG das einzige Immnglobulin ist, welches die Plazentaschranke durchdringen kann (Barrow *et al*, 2008).

2.4 Die CEA-Genfamilie

Es existiert eine Genfamilie auf dem Abschnitt des erweiterten LRC, die immer mehr an immunologischer Bedeutung gewinnt. Man findet sie zwischen den DAP-Genen und dem SIGLEC-Cluster, im Bereich q13.2 bis q 13.3 des humanen Chromosoms 19 (Abb. 4). Diese Familie wird als CEA-Genfamilie bezeichnet und umfasst neben membranverankerten ITIM- oder ITAM-tragenden Mitgliedern auch welche ohne Signalmotiv oder auch einem GPI-Anker, sowie eine Population sezernierter, als PSGs bezeichnete Mitglieder, die gar keine Transmembrandomäne besitzen (Barrow *et al*, 2008).

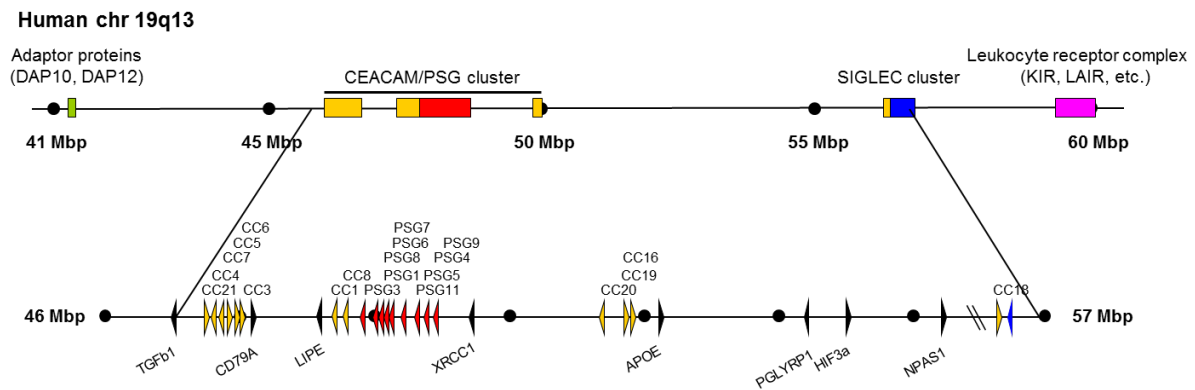


Abb. 4: Lokalisation des CEACAM/PSG-Clusters auf dem humanen Chromosom 19 (Kammerer, unveröffentlicht): Schematisch dargestellt ist der LRC auf dem Chromosom 19 des Menschen. Das Cluster der CEA-Genfamilie befindet sich zwischen den Adapter Proteinen DAP10 und DAP12 und dem SIGLEC-Cluster. Darunter dargestellt ist die Anordnung der einzelnen Mitglieder dieser Familie im Menschen, wobei gelb dargestellt die mindestens membranverankerten Mitglieder der CEA-Genfamilie und rot die PSG-Gruppe zu finden sind. Der Pfeil zeigt dabei die Leserichtung an.

Auch diese Familie lässt sich in unterschiedlicher Ausprägung in den einzelnen Familien der Amnioten finden (Pavlopoulou *et al*, 2014). Wie auch bei anderen Genfamilien des LRC findet man konservierte Vertreter, die speziesübergreifend Orthologe definieren können. Für andere Mitglieder scheint sich die Expression jedoch auf die jeweilige Spezies zu beschränken. Ähnlich wie bei der KIR-Familie wird diese Tatsache auf den Selektionsdruck gegenüber verschiedenen Pathogenen zurückgeführt (Kammerer *et al*, 2004).

2.4.1 Geschichte der CEA-Genfamilie

Der Ursprung der heute komplexen karzinoembryonalen Genfamilie liegt in der Entdeckung eines spezifischen Tumormarkers, dem CEA, der bis heute für die Diagnostik von Kolonkarzinomen genutzt wird (Gold & Freedman, 1965). Gold und Freedman wiesen nach, dass ein Tumormarker von Darmkarzinomen auch in gesundem, fetalem Gewebe zu finden ist, woher die Genfamilie ihre Bezeichnung hat. Auch die Gruppe um von Kleist hat an diesem Antigen gearbeitet, es aber nicht näher betitelt und auch die Vermutung geäußert, dass es sich um dasselbe Molekül, wie bei Gold & Freedman handeln könnte (von Kleist *et al.*, 1969). Im Zuge weiterer Untersuchungen der Gruppe um von Kleist zum CEA gelang es das zweite Mitglied dieser Genfamilie durch Kreuzreaktionen des spezifischen Antikörpers nur wenige Jahre später auch in normalen Gewebeproben von gesunden Probanden nachzuweisen (von Kleist *et al*; 1972) und betitelten es als „Nonspecific cross-reacting antigen“ (NCA), was heute besser unter dem Namen CEACAM6 bekannt ist (Beauchemin *et al*, 1999). Auch in anderen Geweben, wie der Lunge und der Brust, ob tumorös entartet oder gesund, sowie in Plasmaproben, konnte mit Hilfe von Antikörpern gegen CEA NCA detektiert werden, jedoch in deutlich geringerem Umfang, als das beim Kolonkarzinom der Fall war (Pusztaszeri & Mach; 1973). Auch in Proben der normalen Kolonschleimhaut wurde CEA in geringen Dosen detektiert (Fritsche & Mach, 1976), was zu der Vermutung führte, dass es im erwachsenen Menschen nicht ausschließlich kanzerogen beeinflusst vorkommt. In derselben Zeit wurde von Svenberg (1976) das Biliary Glycoprotein 1 (BGP1) als drittes Mitglied der

Genfamilie entdeckt, welches sowohl Gemeinsamkeiten, als auch Unterschiede zu den bis dato zwei bekannten Genen zeigte. Auch dieses kam in gesundem Gewebe z. B. der Gallenblase vor, woher auch sein Name abgeleitet wurde. Es ist heute besser bekannt, als CEACAM1. Die CEA Genfamilie wurde im Menschen, sowie Maus und Ratte genauer untersucht. Im Zuge dieser Untersuchungen wurden strukturelle Gemeinsamkeiten mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie festgestellt, sodass die CEA-Genfamilie in diese eingeordnet wurde (Thompson & Zimmermann, 1988). Aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit untereinander innerhalb derselben Spezies, aber deutlicher Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies, ist davon auszugehen, dass es einen gemeinsamen Vorläufer gibt, der in dem CEACAM1 begründet liegt (Thompson & Zimmermann, 1988 Öbrink, 1997). Neben CEACAM1 gibt es insgesamt vier weitere konservierte Mitglieder zwischen den Spezies, die bei einer Analyse des Mausgenoms entdeckt wurden (Zebhauser *et al.*, 2005). Das CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20, die sich unabhängig von den CEACAM1-Homologen und als eigene Untergruppe innerhalb der CEA-Genfamilie darstellen (Zebhauser *et al.*, 2005).

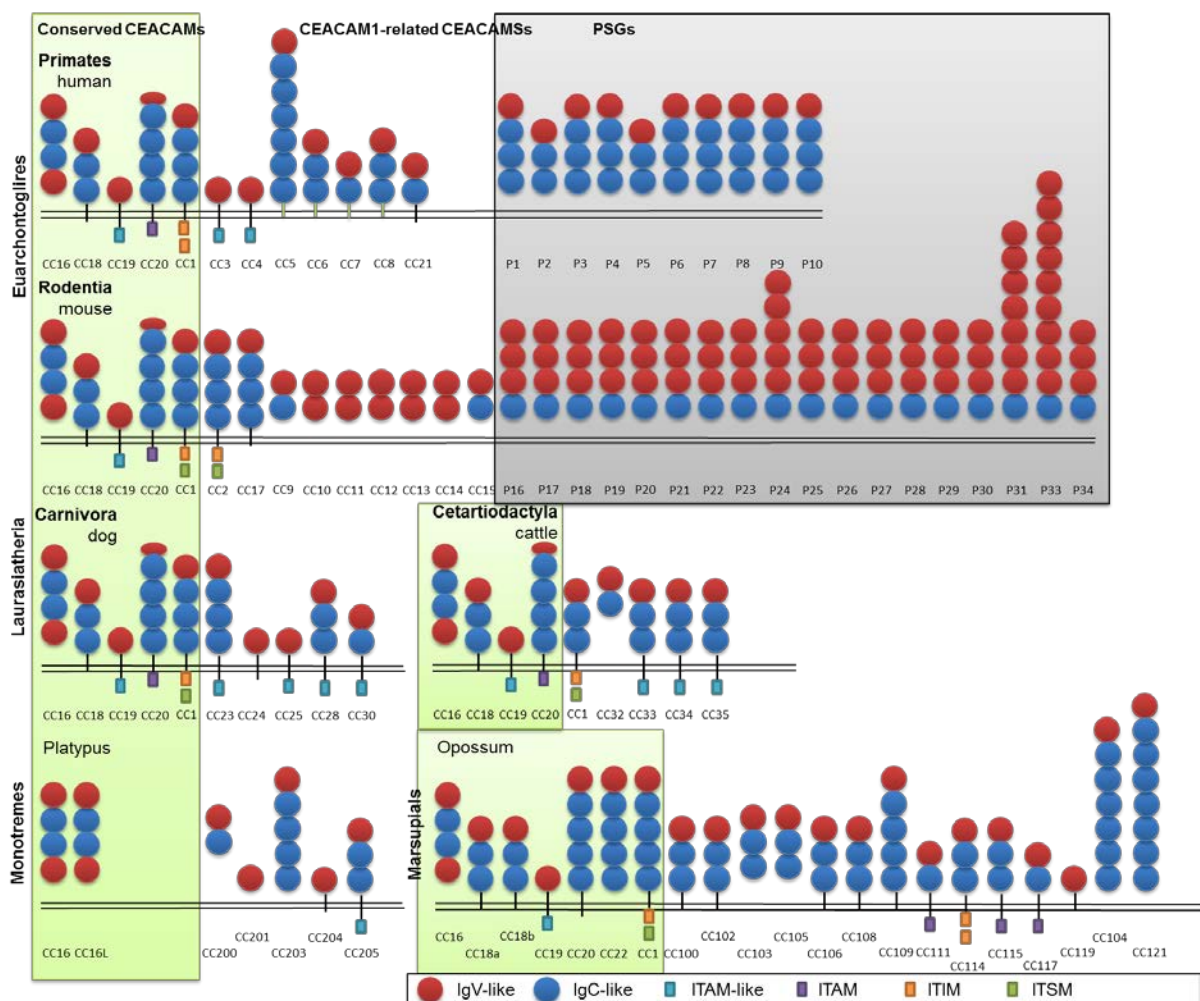


Abb. 5: Die Ausprägung der CEA-Genfamilie in unterschiedlichen Säugetierspezies (modifiziert nach Kammerer & Zimmermann, 2010): Im grünen Kästchen ist die Gruppe der konservierten Mitglieder dargestellt und bis auf das Schnabeltier exprimieren alle hier dargestellten Spezies diese konservierten Mitglieder. Weiß unterlegt sind die speziesspezifischen Homologen des CEACAM1. Grau hinterlegt ist die Untergruppe der PSGs, die nur in einem Teil der untersuchten Spezies nachzuweisen ist. Auffällig ist dabei, dass es sich bei diesen Spezies um solche mit einer hämochorialen Plazentation handelt.

Das am stärksten konservierte Gen dieser Gruppe ist das CEACAM16, welches eine essentielle Funktion für den Hörprozess hat (Zebhauser *et al.*, 2005; Kammerer *et al.*, 2007).

Exprimiert wird es von Zellen, die die Tectorialmembran bilden (Zheng *et al.*, 2011; Kammerer *et al.*, 2012). Diese konservierten Mitglieder sind bis auf wenige Ausnahmen im Genom der bereits untersuchten Spezies zu finden (Abb. 5). Das CEACAM1 sowie Paraloge von ihm, die durch Duplikation in speziesspezifischer Weise entstanden sind, konnte bisher in allen untersuchten Spezies identifiziert werden (Kammerer & Zimmermann, 2010). CEACAM19 und CEACAM20 fehlen aber im Genom vom Schnabeltier, obwohl sie im gemeinsamen Vorfahren der amniotischen Tiere vorhanden sind, wie in Abbildung 6 dargestellt wird (Pavlopoulou *et al.*, 2014).

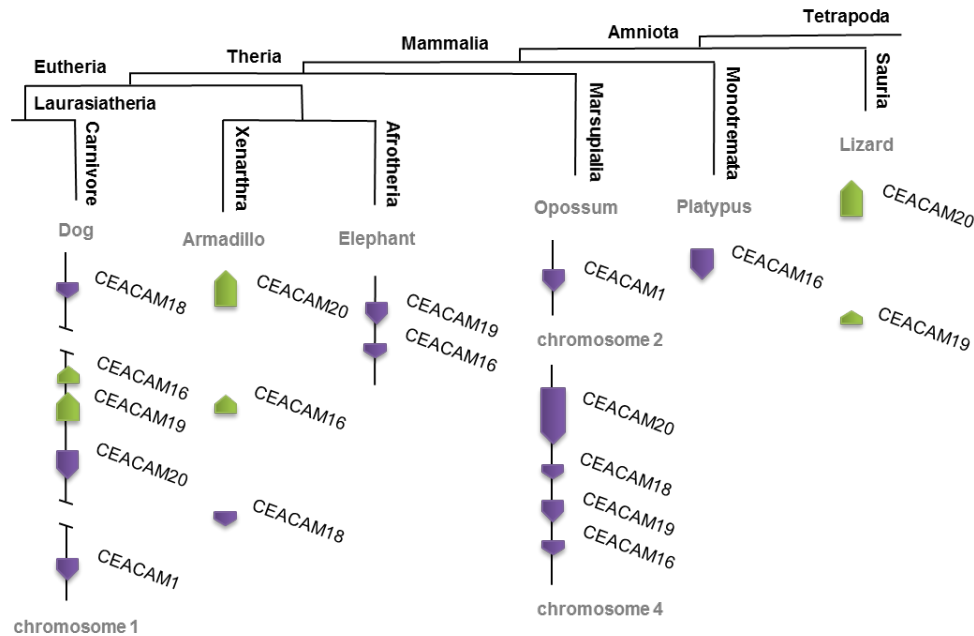


Abb. 6: Stammbaum und Verwandtschaftsgrad der CEA-Genfamilie (modifiziert nach Pavlopoulou *et al.*, 2014; Kammerer & Zimmermann, 2010): Dargestellt ist der Stammbaum der Amniota mit den bei den einzelnen Familien durch Sequenzanalysen vermuteten, bzw. bewiesenen konservierten Vertretern der CEA-Genfamilie. Bestimmte konservierte Mitglieder können nicht in jeder dieser Familien nachgewiesen werden. CEACAM18 beispielsweise taucht erst in einigen Spezies der Theria auf. Wohingegen andere bereits evolutionär sehr früh einmalig erscheinen, wie das CEACAM19 und das CEACAM20 bei den Sauria, um dann erst wieder bei den Mammalia aufzutauchen. Bei den Monotremata ist hingegen nur das CEACAM16 zu finden.

2.4.2 Nomenklatur

Einige CEA-Moleküle wurden zeitgleich von unterschiedlichen Arbeitsgruppen entdeckt, was zu unterschiedlichen Bezeichnungen für dasselbe CEACAM führte. Auch waren aus den Namen der einzelnen Mitglieder noch keine Zusammengehörigkeiten abzulesen, da bei ihrer Entdeckung noch nicht von einer Genfamilie ausgegangen wurde. So wurden einige nach ihrem Auffindungsort benannt, wie das BGP-1, dessen Namen sich von der Gallenblase ableitet, in der es erstmals entdeckt wurde (Svenberg, 1976). Andere, wie das von NCA, wurden nach ihrer Funktion, in diesem Fall der unspezifischen Kreuzreaktionen, benannt (von Kleist *et al.*, 1972). Bei einer stetig wachsenden Genfamilie brachte das über kurz oder lang Verwirrungen und Unklarheiten mit sich. Auch das Ausmaß der Genfamilie war somit schwer zu erfassen, da es nicht erkenntlich war, welche Gene homolog sind oder ganz und gar identisch mit unterschiedlichen Bezeichnungen (Thompson & Zimmermann, 1988). Bei dem jährlichen CEA Workshop in Colorado 1997, an dem Vertreter von 26 Arbeitsgruppen teilnahmen, die an dieser Genfamilie arbeiteten, wurde dieses Problem thematisiert (Beauchemin *et al.*, 1999). Es musste eine einheitliche Nomenklatur für die bekannten und auch für die potentiell noch unbekannt Mitglieder der CEA-Genfamilie gefunden werden. Ein Jahr später wurde eine einheitliche Bezeichnung für die Genfamilie, sowie für ihre einzelnen Mitglieder beschlossen. Als Namensgeber wurde das erste bekannte Mitglied

dieser Familie gewählt, das aus Kolonkarzinomen isolierte CEA-Molekül. In einer Veröffentlichung wurden die alten, sowie die neuen Bezeichnungen der damals bereits bekannten Mitglieder in Mensch und Nager gegenübergestellt. Des Weiteren wurden die Bezeichnungen der Untergruppe der PSGs vereinheitlicht, sowie die bekannten Spleißvarianten der membranverankerten CEACAMs zusammengestellt (Beauchemin *et al.*, 1999).

2.4.3 Aufbau der CEA-Moleküle

Der prinzipielle Aufbau der humanen membranverankerten Mitglieder der CEA-Genfamilie ist vergleichbar. Sie besitzen N-terminal eine Ig-V-ähnliche Domäne, an welche sich eine variable Anzahl an Ig-C-ähnlichen Domänen anschließt (bis heute maximal 6) (Öbrink, 1997). Bei einigen CEACAMs der Maus und beim CEACAM16 in allen Spezies, werden mehr als eine Ig-V-ähnliche Domäne gefunden (Kammerer *et al.*, 2010; CEA homepage). Die CEA-Genfamilie kann in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, zum einen die CEACAMs mit den vorrangig membranverankerten Mitgliedern und der PSG-Untergruppe (**P**regnancy **s**pecific **G**lycoprotein). Innerhalb dieser Untergruppen ist eine hohe Sequenzhomologie zu beobachten (80-95% Übereinstimmung), unter den Gruppen ist sie dagegen etwas geringer (65-75%) (Thompson *et al.*, 1991). Ein erster Hinweis auf die PSG Untergruppe wurde von Bohn entdeckt, der im Serum von schwangeren Frauen ein neues Protein nachgewiesen hat, welches er als schwangerschafts-spezifisches β_1 -Glycoprotein bezeichnet hat (Bohn, 1971). Für den Menschen wurden bisher 29 CEACAM1 homologe Gene identifiziert, zwölf gehören der CEACAM-Untergruppe an, von denen sieben exprimiert werden, und elf der PSG-Untergruppe. Die restlichen sechs werden als Pseudogene eingestuft (Hammarström, 1999). Die Verankerung in der Zellmembran kann unterschiedlich sein, zum einen tritt bei den CEACAMs die Verankerung über eine Transmembran-Domäne mit einem kurzen oder langen zytoplasmatischen Anteil auf. Im Falle des langen zytoplasmatischen Anteils kann dieser dann mit einem modifizierten, tyrosinbasierten Aktivierungs- oder Inhibierungsmotiv (ITAM/ITIM) ausgestattet sein. Oder aber die Membranverankerung erfolgt über einen GPI-Anker, z. B. beim CEACAM5, der über eine Phosphatase abgespalten werden kann und somit ein potentiell lösliches Glykoprotein entstehen lässt. Die GPI-Verankerung ist bisher nur bei Primaten, sowie beim Schwein nachgewiesen worden (Hammarström, 1999; Öbrink, 1997; Kammerer und Zimmermann, 2010).

2.4.4 Bekannte Funktionen der CEACAMs

Das am weitesten exprimierte Mitglied dieser Familie stellt das CEACAM1 dar, was über Epithelzellen bis hin zu Leukozyten gefunden wird und dessen Expression zum Beispiel in T-Zellen induziert werden kann. Es ist eines der fünf Mitglieder, zu denen in mehreren Spezies orthologe Gene identifiziert werden können. CEACAM1 ist an mehreren mitunter essentiellen Prozessen, wie der Neovaskularisation, dem Insulinstoffwechsel und der T-Zell-Regulation beteiligt (Kuespert *et al.*, 2006). Vor allem in der Regulation von Immunzellen scheint CEACAM1 eine bedeutende Rolle zu spielen, so ist es ein sehr kompetenter Regulator der B-Zell-Aktivierung. Über eine Kopplung mit der B-Zell-Rezeptorkomplex können über CEACAM1 sowohl die B-Zell Proliferation, als auch Adhäsion und die Ausschüttung von Immunglobulinen ausgelöst werden (Greicius *et al.*, 2003). Über seine Expression auf dendritischen Zellen konnte sogar nachgewiesen werden, dass CEACAM1 eine ganze Immunreaktion in Gang setzen kann, inklusive der Aktivierung von T-Lymphozyten. Zum einen wird über die Bindung an CEACAM1 auf der Oberfläche dendritischer Zellen die Ausschüttung verschiedener Chemokine ausgelöst, die unter anderen die Migration von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen verursacht. Eben diese T-Zellen können dann wiederum durch CEACAM1-vermittelte Sezernierung von verschiedenen Zytokinen vom naiven in einen geprimten Zustand übergehen (Kammerer *et al.*, 2001). Neben CEACAM1 können auch andere Mitglieder der humanen CEA-Familie Immunreaktionen beeinflussen. So konnten Stern *et al.*, 2005 nachweisen, dass über eine heterophile Bindung von CEACAM1 und CEA die NK-Zell-vermittelte Zerstörung von MHC1-defizienten Zellen

umgangen werden kann. Für Karzinome, die vorrangig CEA exprimieren, stellt das einen möglichen Immunescape-Mechanismus dar. Dieselbe Gruppe hatte ein paar Jahre zuvor schon zeigen können, dass auch über eine homophile Interaktion von CEACAM1 ein Inhibierung von NK-Zellen stattfinden kann, wie stark diese Inhibition ausfällt hängt dabei direkt davon ab, wie viel CEACAM1 exprimiert wird (Markel *et al*, 2002). Doch auch unabhängig von CEACAM1 scheint die Expression von CEA auf Tumorzellen in Anwesenheit von NK-Zellen angeregt zu werden, dabei scheint ein Transfer von CEA auf die NK-Zellen stattzufinden. Auch dieser Prozess inhibiert die NK-Zell-Zytotoxizität, wobei der Rezeptor für CEA unbekannt ist (Stern-Ginossar *et al*, 2007). CEA ist aber auch im gesunden Gewebe, vorrangig lumenseitig auf Epithelien exprimiert und dient dort der Zelladhäsion über homologe Bindungen (Benchimol *et al*, 1989). Die CEA-Genfamilie ist eine sich schnell entwickelnde Familie. Neben den Orthologen lassen sich abhängig von der untersuchten Spezies verschiedene Variationen im Sinne von Spleißvarianten des CEACAM1 finden, die einen Selektionsdruck vermuten lassen, der unter anderem auf Ausweichmechanismen gegenüber Pathogenen zurückgeführt wird (Kammerer *et al*, 2004). Ein weiteres Indiz für eine solche Selektion lässt sich auch aus den Expressionsorten vermuten. Speziesübergreifend findet man neben dem CEACAM1 auch andere Vertreter dieser Genfamilie auf Immunzellen exprimiert oder aber auch von verschiedenen Endothelien oder Epithelien, wie dem Darm, wo Kontakt zu über die Nahrung aufgenommenen Pathogenen durchaus üblich ist (Skubitz *et al*, 1996; Öbrink, 1997; Greicius *et al*, 2003). Dass beispielsweise CEACAM1 in einer seiner Spleißformen einen solchen Beitrag leistet, bewiesen 2012 Chen *et al*. Sie zeigten, dass CEACAM1-S exprimierende T-Zellen im Darm und den dazugehörigen Lymphknoten zu finden sind. Hier ermöglichen sie die Aktivierung von T-Zellen und die Sekretion von IgAs, womit sie zur humoralen Abwehr im Darm beitragen. Auf Granulozyten beispielsweise findet sich im Menschen eine ganze Schar von membranverankerten CEACAM-Mitgliedern. Konkret heißt das, dass insgesamt vier CEACAMs der humanen Genfamilie auf Granulozyten exprimiert werden und in deren Aktivierungsprozess eine Rolle zu spielen scheinen. Neben CEACAM1 in der membranverankerten Form sind noch CEACAM3, CEACAM6 und CEACAM8 auf der Oberfläche exprimiert. Über jedes einzelne dieser Mitglieder können Granulozyten separat aktiviert werden, was über ein gesteigertes Adhäsionspotenzial dieser Zellklasse gezeigt wird (Skubitz *et al*, 1996).

2.4.5 Die Mitglieder der CEA-Genfamilie als Pathogenrezeptor –

Ein Selektionsmerkmal?

Es gibt verschiedene CEACAM-Mitglieder in Mensch und Maus, die als Pathogenrezeptor für verschiedene Keime bekannt sind (Kuespert *et al*, 2006). Die bisher identifizierten Rezeptoren für Bakterien wie *Neisseria ssp.* oder auch verschiedene *E.coli*-Stämme, nur um einige Beispiele zu nennen, sind membranverankerte, vorrangig auf Epithelien exprimierte CEACAMs, speziell CEACAM1, CEA und CEACAM6 (Abb.7). Physiologischerweise sind diese Mitglieder an verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation, Zell-Zell-Kontakten oder auch der Polarisation oder Apoptose beteiligt, wobei sie für diese Prozesse nicht essentiell zu sein scheinen (Tchoupa *et al*, 2014). Die Bakterien wiederum haben sich angepasst und nutzen diese Mitglieder der CEA-Genfamilie um die Schleimhaut zu besiedeln und sich dort anschließend zu vermehren. Dazu haben sie spezielle Adhesine entwickelt, angepasst an die humanen Rezeptoren, um mit diesen zu interagieren. Gebunden an die verschiedenen CEACAMs lösen sie so eine Signalkaskade aus, die in der Endozytose dieser Bakterien in die intakte Epithelzelle enden. Auch der Transport durch die intakte Epithelschicht ist diesen Bakterien so möglich (Tchoupa *et al*, 2014).

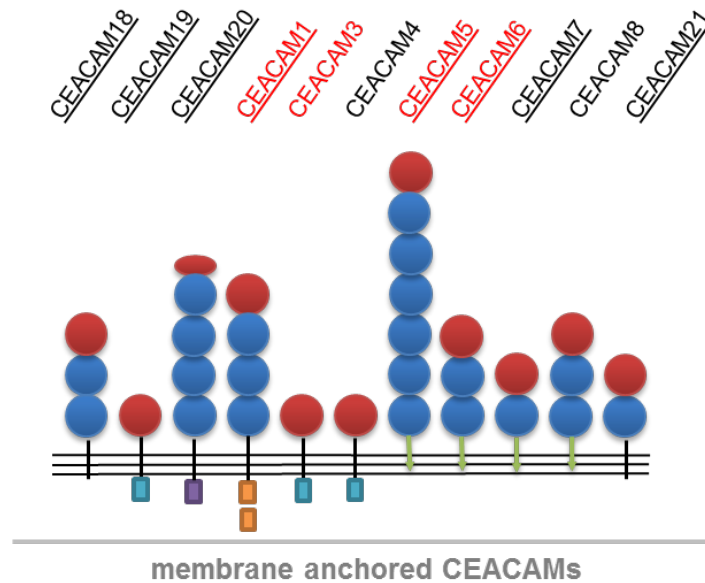


Abb. 7: Die membranverankerten Mitglieder der humanen CEACAMs der CEA-Genfamilie (modifiziert nach Tchoupa *et al*, 2014): Abgebildet ist der schematische Aufbau von allen bekannten humanen CEACAMs mit Membranverankerung. Rot dargestellt ist die N- oder IgV-ähnliche Domäne und blau dargestellt die in unterschiedlicher Anzahl vorhandenen IgC-ähnlichen Domänen. Die Membranverankerung ist schwarz dargestellt und reicht im Falle eines zytoplasmatischen Anteils durch die Membran, mit Signalmotiv am Ende (falls vorhanden). Als grüner Pfeil dargestellt ist die Membranverankerung, im Falle eines GPI-Ankers, der in der CEA-Genfamilie nur beim Menschen auftritt und eine potentiell lösliche Variante darstellt. Die bis heute bekannten Pathogenrezeptoren für verschiedenste Keime sind rot hervorgehoben, epithelial exprimierte Mitglieder sind unterstrichen.

Der menschliche Entwicklungsschritt zur Anpassung dieser Rezeptoren an die pathogene Gefahr geht über einen zweiten, dem CEACAM1 sehr ähnlichen Rezeptor, dem CEACAM3. Anders als das CEACAM1, das vor allem auf verschiedenen Epithelien exprimiert wird, weshalb es von den Bakterien auch als Eintrittspforte missbraucht wird, findet man CEACAM3 ausschließlich auf Granulozyten exprimiert (Kuespert *et al*, 2006; Pils *et al*, 2008). So spielt CEACAM3 eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr bestimmter Pathogene, wie *Neisseria ssp.*, *Haemophilus ssp.* oder *Moraxella ssp.*, die allesamt auch CEACAM1 für ihre Bindung an Zellen nutzen (Schmitter *et al*, 2004). Die CEACAMs, die von diesen Pathogenen als Eintrittspforte genutzt werden, werden genau wie CEACAM3 auch auf Granulozyten exprimiert, wenn auch nicht ausschließlich. Sobald eine Bindung eines dieser drei Pathogene an CEACAM3 erfolgt, wird über eine Phosphorylierung durch eine SRC-Kinase an dem ITAM-Motiv von CEACAM3 die kleine GTPase Rac stimuliert und darüber die Actinpolymerisation, eine Phagozytose oder eine oxidative Antwort reguliert (Schmitter *et al*, 2004). Die Stimulierung der GTPase erfolgt bei Kontakt mit all diesen Pathogenen, jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung. Die stärkste Antwort erfolgt auf das CEACAM-spezifische OPA, dass von *Neisseria ssp.* exprimiert wird (Schmitter *et al*, 2004). An diese coexprimierenden Granulozyten binden mehr Pathogene, als an die anderen, was einen synergistischen Effekt zu haben scheint, da diese CEACAMs selbst zwar die Aktivität der Granulozyten nicht merklich antreiben, aber dem CEACAM3 Substrat liefern, was in einer starken Aktivität gipfelt (Sarantis *et al*, 2012). Somit nutzt der Organismus die Affinität der Pathogene aus, um sie in eine Art immunologische Falle zu locken (Abb.8).

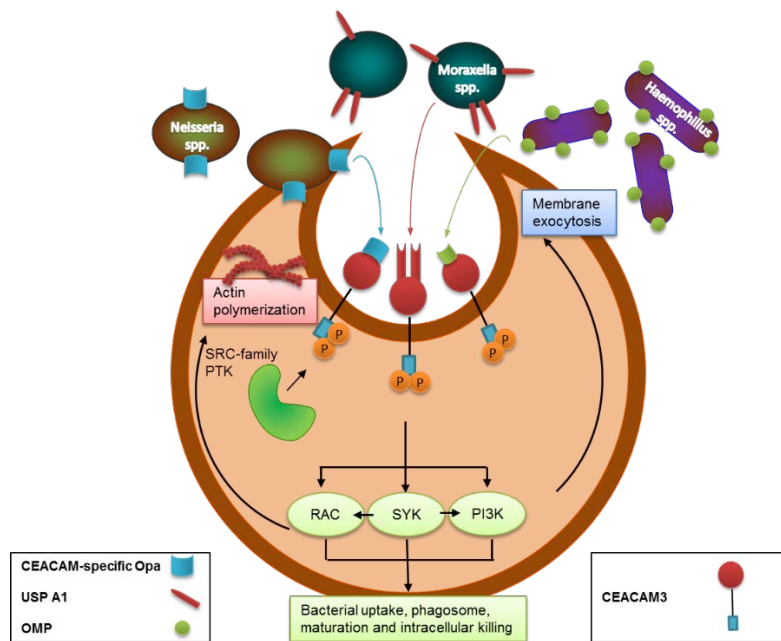


Abb. 8: Signalkaskade ausgelöst durch die Bindung von Pathogenen an den CEACAM3-Rezeptor auf Granulozyten (modifiziert nach Gray-Owen *et al*, 2006): Durch die Bindung von verschiedenen Pathogenen an das CEACAM3, wird im Anschluss an die Bindung des Pathogens das ITAM im zytoplasmatischen Anteil von CEACAM3 von Kinasen der SRC-Familie phosphoryliert. Die Folge ist eine Aktivierung der PI3K (Phosphatidyl-inositol-3 Kinase) und eine RAC-GTPase-abhängige Ansammlung von polymerisiertem Actin in phagozytotischen Vesikeln, die letztendlich den CEACAM-Pathogen-Komplex umhüllen und somit das Pathogen eliminieren. Für die *Neisseria spp.* ist bekannt, dass die Bindung über seinen CEACAM-spezifischen Opa-rezeptor erfolgt (Schmitter *et al*, 2004). Da Neisserien so auch an das CEACAM1 binden, wäre für die anderen Pathogene auch eine CEACAM1-analoge Bindung denkbar. *Moraxella spp.* würde dementsprechend über seinen USP A1 Rezeptor (de Vries *et al*, 2009) und *Haemophilus spp.* über OMP P1 (Tchoupa *et al*, 2015) an das CEACAM3 binden.

Bei der Maus hingegen gibt es zwei Varianten des CEACAM1 (a/b) zu welchen das Pathogen des Maus-Hepatitisvirus zu einem eine Affinität besitzt, Knockout-Mäuse die das andere Allel tragen, sind resistent (Dveksler *et al*, 1993). Und auch beim Rind lassen sich zwei Varianten des CEACAM1 finden, ähnlich denen in der Maus, die auch hier eine pathogen-verursachte Entwicklung vermuten lassen (Kammerer *et al*, 2004). Dieser Pathogenrezeptor, der über die Speziesgrenzen hinaus zu finden ist, legt die Vermutung nahe eine mögliche Ursache für Zoonosen zu sein. Doch auf Grund feiner Unterschiede in der Sequenz, vor allem der Pathogen-Bindestelle, sind diese Pathogene spezies-spezifisch und nicht übertragbar (Voges *et al*, 2010). Allerdings gibt der Hund das erste Beispiel von coexprimierten paarigen Immunrezeptoren der CEA-Genfamilie, die Einblick geben in den möglichen abhängigen Einfluss der beiden während der Aktivität von Lymphozyten. (Kammerer *et al*, 2007).

2.4.6 Die PSG-Untergruppe

Anders als bei Mensch und Maus lassen sich beim Hund keine Mitglieder der PSG-Untergruppe nachweisen, was eventuell in Zusammenhang mit deren unterschiedlicher Plazentationsart steht (Kammerer *et al*, 2007). Wie schon erwähnt, konnte die PSG-Untergruppe bisher nur bei Spezies detektiert werden, die eine haemochoriale Plazenta ausbilden, was dann auch ihren hauptsächlichen Expressionsort darstellt (Kahn *et al*, 1992; Teglund *et al*, 1994; Rudert *et al*, 1992; Rebstock *et al*, 1990; Zhou & Hammarström, 2001). Anders ist es bei Tieren mit einem weitaus weniger innigen Kontakt zwischen fötalem und maternalem Gewebe, wie dem Hund oder dem Rind, wo keine PSGs zu finden sind (Kammerer *et al*, 2007; Kammerer & Zimmermann, 2010). Die Mitglieder der PSG-

Untergruppe unterscheiden sich auch stark in ihrem Aufbau zwischen den Spezies. Wo bei den Primaten der Aufbau stark angelehnt ist an den der CEACAMs mit einer IgV-ähnlichen Domäne und einer unterschiedlichen Anzahl IgC-ähnlicher Domänen, findet man bei den Nagern lediglich eine IgC-ähnliche Domäne, dafür aber eine variierende Anzahl IgV-ähnlicher Domänen, die zumeist drei bis maximal fünf bei der Ratte und sieben bei der Maus betragen (Rudert *et al*, 1992; Rebstock *et al*, 1990; Kahn *et al*, 1992; CEA-homepage). Die Anzahl der PSGs ist sehr unterschiedlich, die meisten Mitglieder zählt diese Familie in der Maus mit 17, deutlich weniger bildet da das Opossum aus, mit lediglich fünf Vertretern und auch der Mensch bildet deutlich weniger aus mit insgesamt zehn potenziellen PSGs (Kammerer und Zimmermann, 2010). Die Mitglieder dieser Untergruppe befinden sich in einer gesonderten Region innerhalb des jeweiligen CEA-Komplexes und sind, zumindest beim Menschen, strukturell sehr ähnlich im Unterschied zu den CEACAMs besitzen sie keine Membranverankerung (Teglund *et al*, 1994; CEA-homepage). Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass zumindest die humanen PSG N-Domänen und die murinen PSG N1-Domänen eine gewisse Konservierung im Genom besitzen, vor allem was die möglichen Protein-Bindungsstellen betrifft, und so trotz unterschiedlicher Entwicklung von einem Vorfahren und struktureller Unterschiede, ähnliche Funktion bewahren (Mc Lellan *et al*, 2005).

2.4.7 Bekannte Funktionen der PSGs

In der Maus gibt es bislang zwei Mitglieder der PSG-Untergruppe, die auch im adulten Tier und nicht von der Plazenta exprimiert werden. Zum einen ist es das PSG18, welches neben der Plazenta auch spezifisch in dem Follikel-assoziierten Epithel der Peyerschen Platten, sowohl in Form von mRNA, als auch als Protein nachgewiesen werden konnte. Dies impliziert eine immunologische Bedeutung über die fetomaternalen Wechselwirkung hinaus, vor allem auch, da nach Inokulation mit Bakterien die Expression noch anzusteigen scheint (Kawano *et al*, 2007). Für dieses Mitglied konnte auch schon nachgewiesen werden, dass es Makrophagen selektiv zur IL-10 Produktion und Expression anregt, dieses reguliert Immunzellen mannigfaltig zugunsten der Schwangerschaft, womit indirekt auch PSG18 schwangerschaftserhaltend wirkt (Wessells *et al*, 2000). Zum anderen ist es das PSG16 (bCEA), welches exprimiert im Gehirn zu finden ist, wo es sogar höher exprimiert wird als in der Plazenta und dort anscheinend auch für bestimmte MHV-Stämme als Rezeptor dient (Chen *et al*, 1995). Über die exakten Funktionen der PSGs bei der Schwangerschaft ist wenig bekannt, bislang kennt man nur einen Rezeptor für PSG17 in der Maus, das Tetraspanin (CD9) (Waterhouse *et al*, 2002). Über diese Bindung werden die murinen Makrophagen zur Expression von verschiedenen Zytokinen, wie IL-10, IL-6, TGF- β 1, angeregt, ähnliches konnte auch schon für die humanen PSG1, PSG6 und PSG11 an humanen Monozyten gezeigt werden, dort ist der Rezeptor jedoch ein anderer, da sowohl CD9-defiziente, als auch CD9-positive Makrophagen gleich stark auf die humanen PSGs reagieren (Snyder *et al*, 2001; Ha *et al*, 2005). Allerdings konnte bezüglich der Plazenta keine wirkliche Co-Lokalisation von dem dort vorherrschend über die gesamte Trächtigkeit exprimierten PSG22 und dem CD9 ausgemacht werden. Zwar wird CD9 auf einigen Zellen des Endometriums exprimiert, jedoch führt ein Knockout von CD9 bei Mäusen nicht zur Beeinträchtigung der Trächtigkeit nach Embryotransfer, was eine essentielle Funktion dieses Rezeptors für die Trächtigkeit ausschließt (Wynne *et al*, 2006). Für humanes PSG1 konnte gezeigt werden, dass es über Heparan-sulfat oder Chondroitinsulfat an Proteoglykane bindet und wird darüber auch mit der essentiellen Vaskularisation des Endothels während der Frühphase der Schwangerschaft in Verbindung gebracht (Lisboa *et al*, 2011). Dass PSGs bei der Vaskularisation eine Rolle spielen müssen, wurde auch anhand des murinen PSG22 und auch des PSG23 aufgezeigt, dass vor allem während der frühen Trächtigungsphase von den Trophoblasten Riesenzellen exprimiert zu werden scheint und nachgewiesen bei Makrophagen, uterinen Dendritischen Zellen und NK-Zellen zu einer erhöhten Expression des Transforming growth factor beta 1 und Vascular Endothelial Growth Factor A führt, allesamt tragen zur Remodelierung endothelialen Durchblutung bei (Blois *et al*, 2012; Wu *et al*, 2008). Des Weiteren wurde beobachtet, dass es bei Anwesenheit von PSG22 zu

Gefäßwachstum kommt egal ob VEGFA anwesend war oder nicht (Blois *et al*, 2012) und dass das auch hier, wie bei PSG1 vermutet, über Heparansulfatbindung an Proteoglykane vermittelt wird. Außerdem werden sowohl für murine, als auch für humane PSGs eine Fibrinogen-Antagonisierende Wirkung vermutet, die die Plättchen-Aggregation und das Thromboserisiko während der Schwangerschaft reduziert (Shanley *et al*, 2013).

2.4.8 Die CEA-Genfamilie des Pferdes

Mit der Entschlüsselung und Veröffentlichung des kompletten equinen Genoms durch Wade und Mitarbeiter ergab sich die Möglichkeit auch diese Spezies nach dem Vorhandensein und der Zusammensetzung der CEA-Genfamilie zu untersuchen (Wade *et al.*, 2009). Ein Anfang wurde dabei in der Arbeitsgruppe Kammerer gemacht, indem ausgehend vom CEACAM1 anderer bereits untersuchter Spezies, wie dem Hund (Kammerer *et al*, 2007) oder der Maus (Rudert *et al*, 1992; Zebhauser *et al*, 2005) nach dem equinen CEACAM1 und seinen Abkömmlingen, sowie den konservierten Mitgliedern CEACAM16 und CEACAM19 mit Suchprogrammen, in öffentlichen Datenbanken gesucht wurde. Es konnten insgesamt drei der fünf konservierten Mitglieder beim Pferd nachgewiesen werden, jedoch finden sich keinerlei Hinweise auf das CEACAM18 oder das CEACAM20. Ausgehend von dem equinen CEACAM1 konnte eine Familie von insgesamt zweiunddreißig Mitgliedern ermittelt werden, drei konservierten CEACAMs, sieben membranverankerten und acht löslichen Mitgliedern der CEA-Genfamilie, sowie insgesamt dreizehn Pseudogenen (Aleksic, D.; 2010) und einem weiteren potentiellen sezernierten Mitglied. Von den membranverankerten Mitgliedern lassen sich bei vier auf Grund der zytoplasmatischen Anteile ein Tyrosin-basiertes Motiv in Form eines ITIM oder ITAM vermuten, neben denen, die bei den konservierten Mitgliedern CEACAM1 und CEACAM19 vorkommen. Nach ersten Expressionsstudien von D. Aleksic und L. Blaschke (Aleksic *et al*, 2016) ließ sich eine verstärkte Expression der sowohl sezernierten, als auch membranverankerten equinen Mitglieder auf Immunzellen vermuten. Nur von den sezernierten Mitgliedern sind im Pferd die vorhergesagten Sequenzen für das gesamte Gen durch Sequenzierungen bestätigt (Aleksic *et al*, 2016). Für die membranverankerten Mitglieder fehlt diese Analyse vor allem mit Blick auf die Tyrosin-basierten Signalmotive noch vollständig. Auch muss die Expression und das Expressionsmuster für diese Mitglieder auf den verschiedenen Immunzellen noch genauer untersucht werden, um eventuelle Rückschlüsse auf die Funktionen zu machen. Das soll im Rahmen dieser Arbeit geschehen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Zentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf
(Kühl-)	Centrifuge 5430R	Eppendorf
(Bakterien-)	Biofuge 13	Heraeus Sepatech
(Zellkultur)	Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
(Tisch-)	Sprout	Biozym
(Vakuum-)	SpeedVac Concentrator mit Vacuubrand RZ 5 Vacuumpump	Vacuubrand Gmbh + Co Kg
Sterilwerkbank	Safe 2020 1.8	Thermo Scientific
Sterilwerkbank	B-[MaxPro] ² -130	Berner Flow Safe
Brutschrank	CO ₂ Incubator MCO- 19AIC	Sanyo
Thermoblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf
Nanodrop	NanoDrop Lite Spectrophotometer	Thermo Scientific
Mikroskop	Diavert	Leitz
Fluoreszenzmikroskop	Diaphot 300	Nikon
PCR Cycler	FlexCycler ²	Analytik Jena AG
Power Supply	Power Pac 200	BioRad
Power Supply	MP-3AP (GN343)	Major Science
Gelkammer	Mini-Sub Cell GT	BioRad
Plattformschüttler (wippend)	Doumax 1030	Heidolph
Inkubationsschüttler	Multitron Standard	Infors HT
Vortexer	Vortex-Genie	WINN (Scientific Industries)
Durchflusszytometer	MACSQuant Analyzer	Milteny Biotec
Gewebeschredder	TissueLyser II	Quiagen
Nukleofektor	Nucleofector 2b Device	Lonza
Geldokumentationssystem	Fusion Xpress	peQlab
Vacuumpumpe	Vacuubrand BVC 21	Vacuubrand Gmbh + Co Kg
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q	MerckMillipore
Zählkammer	Neubauer improved	Brand
Pipetten	Verschiedene Modelle	Eppendorf, Gilson
Pipettierhilfe	PipetBoy II	Integra
MACS-Separator	OctoMACS	Miltenyi Biotec

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Safe-Lock Tubes 1,5 ml; 2ml	Eppendorf
Micro Tubes 1,5ml	Sarstedt
PCR Tubes 0,2 ml	Biozym
Falcon Tube 15ml; 50ml	Sarstedt
Falcon tube 5ml, polystyrene Round-Bottom	BD
25 cm ² ; 75 cm ² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Phenolic-Style Cap	Corning
6-Well Cell Culture Plate, Flat Bottom with Lid	Costar
Ø 5 cm; 10 cm Petrischalen (steril)	Roth
Laborglasflaschen 0,25 l; 0,5l; 1,0l	Duran Group (Vertrieb Roth)
Pipettenspitzen (10 µl; 200 µl; 1000 µl)	Greiner
Filterspitzen (10 µl; 200 µl; 1000 µl)	Biozym
MS Columns	Miltenyi Biotec
Erlenmeyerkolben	Duran Group (Vertrieb Roth)
Messzylinder	Duran Group (Vertrieb Roth)
Reagenzgläser	Duran Group (Vertrieb Roth)
Bechergläser	Duran Group (Vertrieb Roth)
Glastrichter	Duran Group (Vertrieb Roth)
Stainless steel beads (TissueLyser)	Qiagen

3.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
FastDigest (EcoRI; HindIII; XhoI)	Thermo Scientific
+ FastDigest Green Buffer (10x)	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase (5 Weiss U/µl)	Thermo Scientific
+ Rapid Ligation Buffer (5x)	Thermo Scientific
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/µl)	Thermo Scientific
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl; 500 U)	Thermo Scientific
+ DreamTaq Buffer (enthält 20 mM MgCl ₂ ; 10x)	Thermo Scientific
Easy-A HiFi Cloning Enzyme (5 U/µl; 100 U)	Agilent
+ Easy-A Reaction Buffer (10x)	Agilent
AMV Reverse Transcriptase (10 U/µl)	Promega
+ AMV RT Buffer (5x)	Promega
Random Primers (20 µg)	Promega
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl; 2500 U)	Thermo Scientific
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
+ BigDye Terminator v1.1 Sequencing Buffer (5 x)	Applied Biosystems

3.1.4 Kits

Kit	Hersteller
NucleoBond Xtra Midi Plus	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
StrataClone PCR Cloning Kit	Agilent Technologies
BigDye Terminator v1.1 Cycle Seq. Kit	Applied Biosystems
Lonza Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza
Goat Anti-Mouse IgG MicroBeads	Miltenyi Biotec

3.1.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
EDTA-Na ₂ (Reagent Grade, ~99%)	SIGMA
EDTA-Na ₂ (Analytical Grade)	Serva
Natriumchlorid (NaCl; >99,5% p.a., kristallin)	Roth
Kaliumchlorid (KCl; >99,5%)	Merck
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; >99,5%)	Merck
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O; > 99,5%)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ ; min. 99%)	Merck
TRIS (Purity >99,9%)	Invitrogen
Borsäure (>99,8%; kristallin)	Roth
L-Glutamin (>99%)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH; 99% p.a. ISO)	Roth
Bromphenolblau (Na-Salz)	Serva
Xylene Cyanol FF	Fluka
Orange G	Fluka
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl; mind. 99,8%)	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃ ; mind. 99,5%)	Merck
Natriumazid (NaN ₃ ; reinst. >99%)	Merck
HEPES (>99,5% p.a.)	Roth
Ampicillin Natriumsalz (>99%)	Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth
Natriumacetat (Na ; mind. 99% z.A. ACS)	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O; mind. 99,5 %)	Merck
Ammoniumperoxidsulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ ; mind. 98%)	Merck
Dextrose	SIGMA
Trypsin (1:250)	Invitrogen
UltraPure Agarose	Gibco BRL
SDS (Natriumlaurylsulfat; >99%)	Merck
Magermilch-Sprühpulver	BackTag
BSA (Albumin bovine Fraction; pH 7)	Serva
Bacto Trypton	BD
Bacto Yeast Extract	BD
Bacto Agar	DIFCO Laboratories
Essigsäure (100 % p.a.)	Roth
DEPC (Purity >97%)	Affymetrix USB
Glycerin (wasserfrei; 99,5%)	Fluka
DMSO (zur Synthese; 99,5%)	Roth
Ethanol, 96% vergällt (>96%, mit ca. 1% MEK)	Roth
Ethanol (99,8% p.a.)	Roth

Methanol (99,9% p.a. ACS, ISO)	Roth
Isopropanol (>99,8% p.a. ACS, ISO)	Roth
Chloroform (>99% p.a.)	Roth
Formamid (mind. 99,5%)	Serva
Glycin (>99% p.a.)	Roth
Temed (Tetramethylethylendiamin; 99% p.a.)	Roth
Salzsäure (HCl, 37% p.a. ACS, ISO)	Roth
β-Mercaptoethanol (mind. 98%)	Merck
Trypanblau	Lachema (Chempol)
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco BRL
Mem Amino Acid Solution (50x)	Gibco BRL
RPMI 1640, ohne Serum (Zb19d)	Zellbank, Insel Riems
FCS Gold Plus	Bio&SELL
FBS GOLD	PAA (GE healthcare)
Ficoll (Lymphozyte Separation Medium, LSM 1077)	PAA (GE healthcare)
TRizol Reagent	Ambion
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
RNALater Solution	Ambion
Random Primers	Promega
dNTPs (dGTP, dCTP, dATP, dTTP; 100 mM)	Promega

3.1.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Monoclonal Anti-FLAG, antibody produced in mouse, 3,8mg protein/ml, 0,05ml (Primär)	SIGMA
Monoclonal Mouse Anti Horse CD4 Purified, IgG1; 1,0 mg/ml; 0,1 mg (Primär), Clone CV84	AbD Serotec
Monoclonal Mouse Anti Horse CD8 Purified, IgG1; 1,0 mg/ml; 0,1 mg (Primär), Clone CV88	AbD Serotec
Monoclonal Mouse Anti Human CD21 Purified, IgG1; 1,0 mg/ml; 25 µg (Primär), Clone Bu33	AbD Serotec
Monoclonal Rat Anti Human CD3, FITC Purified, conjugated to FITC; 0,1 mg/ml; 25 µg (Primär), Clone CD3-12	AbD Serotec
PE Rat Anti-Mouse IgG1, Rat LOU, 0,2 mg/ml, Clone A85-1	BD Biosciences
Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-GFP; IgG1, 0,2 mg/ml, Clone 1A12-6-18	BD Biosciences

3.1.7 Primer

3.1.7.1 Primerpaare endogen (Tabelle 2)

CEACAM	Strang	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Template
CEACAM16	5'	ACAACGTCACCCTGGCTGTC	503 bp
	3'	AGACCTCACACTGGTAGGCT	
CEACAM19	5'	GGCCCAGTGCTGCTTCTCAA	403 bp
	3'	CACCTGAACCTCAGTCTTGG	
CEACAM1	5'	TGCATCATATAAGATAGGCCAG	367 bp
	3'	AGTGAGAGTCCTCTTGCCAGG	
CEACAM41	5'	CATTGCATGTGATAGAGCGAC	246 bp
	3'	CGTCCTTCTGTTCTGTGACTGT	
CEACAM42	5'	AGGGGAAGGAATAGATCCCG	392 bp
	3'	GAGTCCTGTTGTCCGAGGATAG	
CEACAM43	5'	CCCATCAAGAAATTGTGTCCT	276 bp
	3'	ATGTTAACTACTACAGGGTCCCTG	
CEACAM45	5'	GCGATAGGGCAACAAGAAATTAT	254 bp
	3'	CATGTTAACTACTACAGGGTCCTCA	
CEACAM46	5'	AGTCCCACCCAATGGTATCC	525 bp
	3'	CCCAAGTATTGCCCTTCTGT	
CEACAM49	5'	TGGAGCACGTCCACATAAAC	232 bp
	3'	GGAGGTATTTGACCCTGGATT	
CEACAM50	5'	AGATGCTCTTGAAGGAACGGAT	453 bp
	3'	GACAGCTTCAGCCAGGTCCTA	
CEACAM53	5'	TTCAAAGGGGAAATAGATTCCA	394 bp
	3'	GAGTCCTGTTGTCTGGGGAC	
CEACAM54	5'	ATCAGTCCCTGGCTTCAGA	409 bp
	3'	TACACGGAGCTGTATACTTC	
CEACAM55	5'	CCCTACTAGTCACGAGGAAGAAC	222 bp
	3'	CATCCTCTCGGTCAGTCACA	
CEACAM56	5'	CCTGTCTGGAGAGGGTACAT	301 bp
	3'	GGGACCCATCAGGGTATATT	
GAPDH	5'	GAGCTGAATGGGAAGCTCAC	393 bp
	3'	CTGAGGGCCTTTCTCCTTCT	

3.1.7.2 Primerpaare full length (Tabelle 3)

CEACAM	Strang	Sequenz in 5' - 3' - Richtung	Template
CEACAM16	5'	GAGACCCGGGCTTGGGGCGA	1382 bp
	3'	AGCCAGTGGTCCTCCACTCG	
CEACAM19	5'	GTGACCCCTTGGTATCTCCA	904 bp
	3'	GTCACCTTTTCTGCAGGTACG	
CEACAM41	5'	GAGCAGTGCTTGTGAGCATT	1131 bp
	3'	TAAGGGGAAGTTCCTGAAGG	
CEACAM42	5'	TCACAGAGGGAGGGACAGAG	1390 bp
	3'	GGGTAAAGGGATCCTTCCAG	
CEACAM45	5'	TCACAGAGGAAAGGACAGAGC	1539 bp
	3'	CCTTGATTCTGGACATTGAA	
CEACAM46	5'	AGCAAACAGCAGCCACCAT	713 bp
	3'	CCAGGAGGTAACCTTTACTGGA	
CEACAM48	5' + HindIII	GTCAGTAAGCTTCAAAGGGAGGAACAGAGCAG	728 bp
	3' + XbaI	GTCAGTTCTAGAGCAGCATGAGGAGGTCACCTT	
CEACAM49	5' + XhoI	GTCAGTCTCGAGCCAAGCTCTTCTCACAGACG	530 bp
	3' + EcoRI	GTCAGTGAATTCGCGGCTCTGTAAGTGGGGTCTT	
CEACAM50	5'	CAGGAGTGCTTGTGAGAGTT	1459 bp
	3'	AGGGAAGAGGCTTCGTCTTC	
CEACAM53	5'	CAGAGGGAGGGACAGAACAG	1163 bp
	3'	ATGGCAGTTAGCCTTGGAGA	
CEACAM54	5'	TCTCACAGAGGGAGGAGCCA	916 bp
	3'	AGTCAGCAGTGCAGGAAACA	
CEACAM55	5' + XhoI	GTCAGTCTCGAGGGGCATAAGCTCTTCTCACG	472 bp
	3' + EcoRI	GTCAGTGAATTCGTATATGTGGAGCTCTCCAA	

3.1.7.3 Primerpaare für die TM-Domäne (Tabelle 4)

CEACAM		Sequenz in 5' - 3' - Richtung	Template
CEACAM42	5'	TCACAGAGGGAGGGACAGAG	1121 bp
	3'	CATGGTGGCTCACCTTTGAG	
CEACAM45	5'	TCACAGAGGAAAGGACAGAGC	1379 bp
	3'	AAGAAAGTGAAGCGGAGCTG	
CEACAM50	5'	CAGGAGTGCTTGTGAGAGTT	1200 bp
	3'	AAACATGGCAGTTCACCTTG	
CEACAM54	5'	TCTCACAGAGGGAGGAGCCA	748 bp
	3'	ACATTGGACGGTATGATGGC	

3.1.7.4 Primerpaare für die Klonierung (Tabelle 5)

CEACAM		Sequenz in 5' - 3' - Richtung	Template	Vektor
CEACAM41	5' + XhoI	GTCAGTCTCGAGCAGAGCAGGCAGCA GACACC	801 bp	pEGFP-N3
	3' + EcoRI	GTCAGTGAATTCCAGAAGAGGGGACA AAGGGAG		
CEACAM45	5'	CAGAGGAAAGGACAGAGCAG	1575 bp	Strata Clone
	3'	GTGGGAAGGCTGAAGTTGGT		
CEACAM50	5'+HindIII	GTCAGTAAGCTTACCCAACCTCACTATT GAATCG	861 bp	pFLAG-CMV3
	3'+EcoRI	GTCAGTGAATTCTTAACCTTCTGAATAA ACTGT		
CEACAM54	5' + HindIII	GTCAGTAAGCTTCAAATCATTATTGAA TCGGTG	594 bp	pFLAG-CMV3
	3'+EcoRI	GTCAGTGAATTCTCAGATATGTAGAAA GTACAC		

3.1.7.5 Primerpaare zur Sequenzierung der Vektoren (Tabelle 6)

Vektor		Sequenz in 5' - 3' - Richtung	Template
pSC-A kan/amp	5'	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	MCS
	3'	TAATACGACTCACTATAGGG	
pEGFP-N3	5'	ATGGGCGGTAGGCGTG	MCS
	3'	CGTCGCCGTCCAGCTC	
pFLAG-CMV3	5'	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	MCS
	3'	CCAGCTTGGTCCCAATAGA	

3.1.8 Puffer und Lösungen

<u>10x PBS</u> NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ H ₂ O (Reinstwasser) • pH 7,0 – 7,2, autoklavieren	80,0 g 2,0 g 14,4 g 2,0 g add. 1,0 l
<u>1x PBS</u> NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ H ₂ O (Reinstwasser) • pH 7,0 – 7,2, autoklavieren	80,0 g 2,0 g 14,4 g 2,0 g add. 10,0 l

<u>Erythrozyten-Lyse-Puffer</u> NH ₄ CL EDTA KHCO ₃ H ₂ O (Reinstwasser) <ul style="list-style-type: none"> pH 7,4 mit 5 M KOH-Lösung einstellen, sterilfiltrieren 	8,3000 g 0,0372 g 1,0000 g add. 1,000 l
<u>10x Azidpuffer</u> NaN ₃ BSA 1x PBS <ul style="list-style-type: none"> sterilfiltrieren 	1,0 g 2,0 g 100 ml
<u>1x Azidpuffer</u> 10x Azidpuffer 1x PBS	50 ml add. 500 ml
<u>MACS-Puffer</u> 0,5% BSA (Endkonzentration) 1x PBS 2 mM EDTA (Endkonzentration) <ul style="list-style-type: none"> sterilfiltrieren 	0,5 g 74,4 mg 100 ml
<u>HEPES-Lösung 10 mM Endkonzentration</u> HEPES H ₂ O (Reinstwasser) <ul style="list-style-type: none"> sterilfiltrieren 	23,82 g add. 100 ml
<u>L-Gutamin (2 mM Endkonzentration)</u> L-Gutamin H ₂ O (Reinstwasser) <ul style="list-style-type: none"> zum Lösen erwärmen, sterilfiltrieren 	4,17 g add. 100 ml
<u>Penicillin/Streptomycin/Glutamin-Mix</u> Pen/Strep-Mix HEPES L-Glutamin	1,5 ml 3,5 ml 5,0 ml
<u>Zellmedium</u> FCS Pen/Strep/Glu- Mix nicht essentielle AS ZB 19d (RPMI, Zellbank Riems)	50 ml 10 ml 5 ml add. 500 ml
<u>Einfriermedium</u> ZB 19d (RPMI) DMSO FCS <ul style="list-style-type: none"> sterilfiltrieren 	70 ml 10 ml 20 ml
<u>LB-Medium</u> Trypton Yeast extract NaCl H ₂ O(Reinstwasser) <ul style="list-style-type: none"> pH 7,5 - 7,6 mit NaOH einstellen, autoklavieren 	10 g 5 g 5 g add. 1,0 l
<u>LB-Agar</u> Bacto-Agar LB-Medium <ul style="list-style-type: none"> autoklavieren, anschließend Antibiotikum (1:1000) zufügen Petrischalen befüllen 	6,5 g add. 500 ml

<u>1x TBE-Puffer</u>	
Tris	10,8 g
Borsäure (kristallin)	5,2 g
EDTA	0,7 g
DEPC-H ₂ O	add. 1,0 l
<u>0,5 M EDTA-Lösung</u>	
EDTA	18,165 g
H ₂ O (Reinstwasser)	100 ml
<ul style="list-style-type: none"> erst in der Hälfte Reinstwasser bei pH 8,0 lösen den pH mit NaOH einstellen 	
anschließend auffüllen auf das Gesamtvolumen	
<u>6x Loading Dye</u>	
Bromphenolblau	30 mg
Xylencyanolblau	60 mg
Orange G	60 mg
0,5 M EDTA (pH 8,0)	1,2 ml
Glycerol (87%)	17,3 ml
H ₂ O (Reinstwasser)	add. 30,0 ml
<u>50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)</u>	
Tris	242,0 g
0,5 M EDTA	100,0 ml
Essigsäure	51,1 ml
H ₂ O (Reinstwasser)	add. 1,0 l
<ul style="list-style-type: none"> autoklavieren 	
<u>1x TAE-Puffer</u>	
50x TAE-Puffer	100 ml
H ₂ O (Reinstwasser)	5000 ml
<u>0,1 M NaCl</u>	
NaCl	5,844 g
H ₂ O (Reinstwasser)	1,0 l
<u>4 M NaOH</u>	
NaOH-Plättchen	8,0 g
H ₂ O (Reinstwasser)	50 ml
<ul style="list-style-type: none"> 30 ml Reinstwasser vorlegen, Plättchen darin auf Eis lösen anschließend mit Reinstwasser auffüllen 	
<u>dNTPs 100 mM</u>	
dGTP (100 mM)	10 µl
dCTP (100 mM)	10 µl
dATP (100 mM)	10 µl
dTTP (100 mM)	10 µl
<u>Gel Red Färbebad</u>	
0,1 M NaCl	115,0 ml
Gel Red (10000x in H ₂ O)	34,5 µl
<u>ATV (von Zellbank Riems angesetzt)</u>	
NaCl	8,50 g
KCl	0,40 g
Dextrose	1,00 g
NaHCO ₃	0,58 g
Trypsin (1:250)	0,50 g
EDTA (Serva)	0,20 g
H ₂ O (Reinstwasser)	add. 1,00 l
<ul style="list-style-type: none"> pH auf 7,2 einstellen 	

3.1.9 Gewebeproben vom Pferd zur Analyse der CEACAM-Expression

In RNAlater (von Pferdeschlachtereier Beerwart Benzstraße 11 71332 Waiblingen)

Schlachttag: Montag, 02.03.09

26 jähriger Wallach Tinker (Irish Cob Crossbred) H = Stute Schleswiger Kaltblut

Pathologie FU (Freie Universität Berlin; Oertzenweg 19b; 14163 Berlin):

Proben vom 07.07.14; Anglo-Araber weiblich

Gewebe	Proben Nr.	Bemerkung
Blut	Siehe 41-44	
Milz	1	
Lymphknoten (Darm)	2	
Großhirn	3a	FU (nicht verwendet)
Kleinhirn	3b	FU (nicht verwendet)
Leber	4	
Zunge	5	
Ösophagus	6	
Magen	7	
Duodenum	8	
Jejunum	9	
Ileum	10	
Blinddarm	11	
Kolon	12	
Rektum	13	
Luftröhre	14	
Lunge	15	
Haut	16	
Skelettmuskel	17	
Arterie	fehlt	
Vene	19	
Niere	20	
Nierenbecken	21	
Prostata	22	FU (nicht verwendet)
Hoden (10.04.14)	23a	(nicht verwendet)
Nebenhoden (10.04.14)	23b	(nicht verwendet)
Ovar	24H	
Eileiter	25H	
Uterusschleimhaut	26H	
Zervix	27H	
Euter	28	
Fett	29	

Herzmuskel	30	
Leber	31	
Speicheldrüse	32	
Lymphknoten (Kopf)	33	
Ösophagus Mundteil	34 H	
Euter Strichkanal	35 H	
Pankreas	36 H	
Eierstockfollikel	37 H	
Eileiter	38 H	
Blase	39 H	
Vulva	40 H	
PBL	41 H	
PBL IL-2; 7d	43	
PBL IL-2; 14d	45	
PBL IL-2; 19d	46	
Endometrial Cups	47	
Granulozyten	48	Trakehner, wbl.
Retina	49	FU (nicht verwendet)
Luftsack	50	FU (nicht verwendet)
Nasennebenhöhle(Epithel)	51	FU (nicht verwendet)
Bulbus olfactorius	52	FU (nicht verwendet)
Hypophyse	53	FU
Cochlea (Innenohr)	54	FU

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Verwendete Zelllinie

Für die Überprüfung der Proteinexpression wurden COS-7 Zellen (CV-1 origin, SV40 tragend) verwendet, die aus der Zellkultursammlung des Friedrich Loeffler Instituts stammen. Die Zellen gehören zu einer etablierten, immortalisierten Fibroblasten-Zelllinie, die aus dem Nierengewebe der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen und stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert wurde, wodurch sie das so genannte large T-Antigen produzieren. Sie wachsen spindelzellartig als Monolayer adhärent auf dem Boden der Zellkulturflaschen.

3.2.1.2 Zellkultur

Die COS-7 Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen (T75, Corning) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für die Anzucht wurde RPMI Medium verwendet, das auf 500 ml mit 50 ml Kälberserum (10% FCS in der Endkonzentration), 10 ml Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Mix und 5 ml MEM-Amino-Acid-Solution 50fach (nichtessentielle Aminosäuren, 1% in der Endkonzentration) versetzt wird. Pro 75 cm²- Kulturflasche wurden 10 ml Medium auf die Zellen gegeben und etwa alle 3 – 4 Tage wurde das Medium gewechselt. Wenn etwa 80 – 90% des Flaschenbodens konfluent bewachsen war, wurden die Zellen 1:5 - 1:7 passagiert. Dazu wurden alle benötigten Lösungen zuvor auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt, dann das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, das PBS wurde anschließend auch abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden daraufhin mit 2 ml ATV versetzt und für 1-2 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich ein Großteil der Zellen sichtbar vom Boden gelöst hat. Als nächster Schritt wurde das Trypsin-Zell-Gemisch mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und die restlichen, am Boden anhaftenden, Zellen durch mehrfaches Spülen gelöst. Diese Suspension wurde dann vollständig mit der Pipette aufgenommen und in einen 15 ml Falcon überführt, um dann bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das entstandene Zellpellet in 5 – 7 ml Medium (je nach Umsetzungsverhältnis) aufgenommen und gut vermischt. 1 ml der so entstandenen Zellsuspension wurde entnommen und in eine neue Kulturflasche überführt, der Rest verworfen. Dazu wurden noch 9 ml RPMI-Medium gegeben, sodass am Ende wieder 10 ml Medium in der Flasche waren. Diese wurde wieder unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.3 Isolierung von peripheren mononuklearen Zellen (PBMC) aus heparinisierem Vollblut

Die mononuklearen Zellen kann man über eine Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe von Ficoll aus dem heparinisierten Vollblut isolieren. Bei Ficoll handelt es sich um ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, das synthetisch hergestellt wird. Ficoll zeichnet sich dadurch aus, dass es hochverzweigt und hydrophil ist, in wässriger Lösung aber neutral reagiert. Außerdem besitzt es auf Grund seiner hohen molaren Masse faktisch keine osmotische Aktivität, was es besonders geeignet für die Dichtegradientenzentrifugation macht.

Die Blutproben wurden als heparinisierte Vollblutproben à 50 ml von gesunden, mittelalten Konik-Ponys unterschiedlichen Geschlechts oder einer Trakehnerstute entnommen und im Labor unter der Sterilwerkbank 1:1 mit PBS verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 25 ml auf bereits vorgelegte 25 ml Ficoll in 50 ml Tubes geschichtet (Abb.9). Danach wurde bei 2500 rpm für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Blutbestandteile werden so ihrer Dichte nach aufgetrennt, wobei sich unten die dichteste Phase bildet, bestehend aus den Erythrozyten und den toten Zellen. Darüber lagern sich in einer dünnen Schicht die Granulozyten ab. Über den Granulozyten liegt die Ficoll-Schicht, an die sich oberhalb die so genannte Interphase anschließt, in der sich die Peripheral Blood Mononuclear Cells befinden

(Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen = PBMCs). Den oberen Abschluss bildet die Plasma Phase inklusive der Thrombozyten (Abb.9). Die Interphase wird vorsichtig abgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt, das Falcon wird mit Medium aufgefüllt und bei 1500 rpm für 5 min mit Bremse zentrifugiert. Pro 50 ml Falcon werden die PBMCs in ein separates 15 ml Falcon gesammelt. Der Waschschrift wird nochmals wiederholt. Sofern mehrere 15 ml Falcons eingesetzt wurden, können sie jetzt in einem vereinigt werden. Danach wird das entstandene Pellet in 10 ml PBS aufgenommen und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

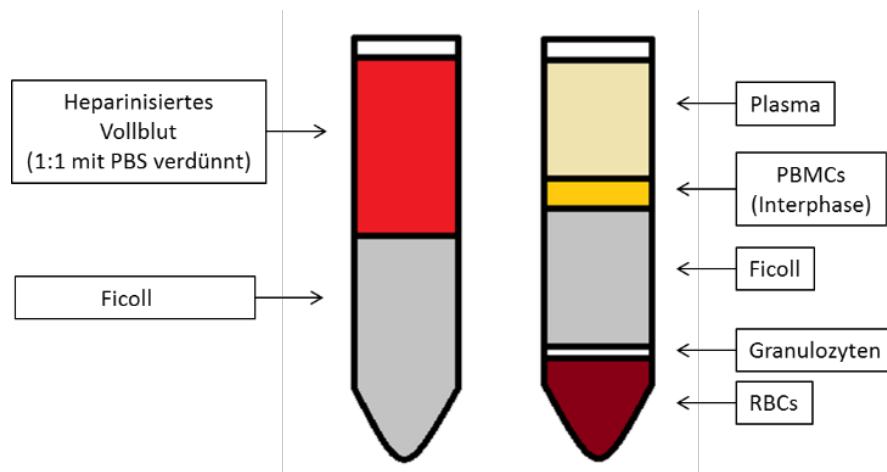


Abb. 9: Aufreinigung der Vollblutproben mittels Dichtegradientenzentrifugation. Schematisch dargestellt ist ein 50 ml Falcon links vor dem Zentrifugationsschritt mit 1:1 mit PBS verdünntes, heparinisieretes Vollblut auf den gleichen Volumenanteil Ficoll geschichtet und rechts dasselbe Falcon nach der Zentrifugation bei 2500 rpm für 30 min ohne Bremse mit der Auftrennung der einzelnen Bestandteile nach ihrer jeweiligen Dichte. Die Auftrennung verläuft von oben nach unten betrachtet in folgenden Schichten: die oberste Schicht bilden das Plasma und die Thrombozyten, die zweite Schicht wird als Interphase bezeichnet und enthält die PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts), die dritte Schicht bildet das Ficoll, in der darunter gelegenen, dünnen vierten Schicht finden sich die Granulozyten und die unterste Schicht wird von den RBCs (rote Blutzellen) und Zelltrümmern gebildet.

3.2.1.4 Aktivierung der Lymphozyten mit Interleukin 2

Die gewonnenen Lymphozyten werden in 7 – 15 ml RPMI-Medium in einer 25 ml-Kulturf flasche angesetzt, wobei $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingesetzt werden. Zu diesem Ansatz wird humanes Interleukin 2 (Proleukin; $1 \cdot 10^6$ U/ml) gegeben, wobei auf 1 ml Medium $5 \cdot 10^5$ U Interleukin kommen sollen. Interleukin 2 ist ein Immunstimulans und wird auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet. Es bindet an den IL-2-Rezeptor, der fast ausschließlich von den T-Zellen exprimiert wird und regt deren Proliferation und Differenzierung an. So kann eine Kultivierung der Lymphozyten über einen längeren Zeitraum erfolgen.

Die Kulturf laschen werden aufrecht, bei 37°C und 5% CO_2 bis zu 21d in einem Brutschrank inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0d, 4d, 6d, 8d, 11d, 13d, 15d, 19d, 21d) wurden Zellen entnommen und für die RNA-Extraktion, zur Durchflusszytometrie und für die magnetische Zellseparation verwendet.

3.2.1.5 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell-sorting = FACS)

Die Durchflusszytometrie (Zytometrie = Zell-Vermessung) ist eine Methode, die in der Biologie und Medizin zur Zellanalyse für Einzelzellen in Suspension verwendet wird. Das Untersuchungsprinzip beruht auf einer Emission von optischen Signalen durch die Zellen, die mittels hydrodynamischer Fokussierung vereinzelt und nacheinander perlschnurartig durch eine Messzelle geführt werden. Um diese zu erzeugen, wird die Zelle je nach Bauart des

Durchflusszytometers von einem oder mehreren Lasern zeitgleich oder nacheinander in der Messzelle beleuchtet (Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$). Dabei entsteht Streulicht, das abhängig von der Größe der Zelle in Vorwärtsrichtung (FSC) und abhängig von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge an Vesikeln in Seitwärtsstreuung (SSC) verläuft. Mit diesen beiden Parametern ergibt sich für jeden Zelltyp ein charakteristisches Muster, wodurch die einzelnen Zellpopulationen der Messprobe unterschieden werden können. Durch Zuhilfenahme von Fluorochromen die intra- oder extrazellulär in Form von spezifischen, konjugierten Antikörpern an charakteristische Rezeptoren binden und durch den Laserstrahl zur Emission von Lichtquanten bestimmter Wellenlänge angeregt werden, ist eine weiterführende Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen möglich.

Es wurden für den Versuch Doppelansätze von $2 \times 2,5 \cdot 10^5$ Zellen für CD4, CD8, CD21 und nativen Zellen gemacht. Die entsprechenden Primärantikörper sind nicht direkt markiert und bedürfen eines sekundären Antikörpers, der PE markiert ist. Die Zellen werden zuerst mit $0,5 \mu\text{l}$ des jeweilig spezifischen Antikörpers (CD4; CD8; CD21) und $50 \mu\text{l}$ Acidpuffer 30 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und anschließend zweimal mit 2 ml Acidpuffer gewaschen und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wird der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper nach gleichem Prinzip aufgetragen und nach 30 min durch zweimaliges Waschen mit 2 ml Acidpuffer die ungebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wird je eine Zellpopulation der Doppelansätze in $100 \mu\text{l}$ Acidpuffer aufgenommen. Der andere Teil wird mit einem CD3 FITC-Antikörper zusätzlich markiert. Da es sich um einen intrazellulären Marker handelt, müssen die Zellen vor der Färbung fixiert werden. Das passiert mit $150 \mu\text{l}$ 2%iges Paraformaldehyd, mit dem die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert werden. Anschließend werden sie bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Der daraufhin zugegebene Puffer B ($150 \mu\text{l}$) sorgt dafür, dass Poren in der Zellwand entstehen, sodass der Antikörper eindringen kann. Nach dem nochmaligen Zentrifugieren, werden die Zellen mit $50 \mu\text{l}$ Puffer B und $5 \mu\text{l}$ Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend werden die Zellen drei Mal mit $150 \mu\text{l}$ Puffer B gewaschen und dann zur Messung im Durchflusszytometer in $100 \mu\text{l}$ Acidpuffer aufgenommen. Die unfixierten Zellen werden doppelt gemessen, einmal ohne Propidiumiodid und einmal 1:1 mit einer 1:1000 Verdünnung versetzt, um eine Lebend-Tot-Färbung zu ermöglichen. Bei dem Versuch wurden mittels des Macs Quant diese 3 Parameter (Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenz) parallel für jede Zelle erfasst und gespeichert. Anschließend wurden die Daten mit Hilfe der „MACS Quantify“ Software ausgewertet und in einem Streudiagramm als korrelierte Zweiparameterdarstellung in Form von Dotblots angezeigt.

3.2.1.6 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) von Miltenyi Biotec stellt ein Zellsortierungsverfahren dar, bei dem einzelne Zellen auf Grund ihrer Oberflächenstrukturen magnetisch unterstützt aus einer Zellsuspension separiert werden. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Für den Versuch werden zwei Ansätze mit $1 \cdot 10^7$ Zellen aus der PBMC-Mischkultur mit dem CD4, bzw. CD8 Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln im Kühlschrank inkubiert. Nach der halben Stunde werden die Zellen einmal mit 2 ml Acidpuffer gewaschen (5 min bei 1500 rpm zentrifugieren), dann nochmals mit 1,5 ml MACS Puffer. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in $80 \mu\text{l}$ MACS Puffer aufgenommen und mit $20 \mu\text{l}$ Antikörpern versetzt, die über Polysaccharide an etwa 50 nm große, superparamagnetische Partikel gekoppelt sind (MicroBeads). Dieses Gemisch wird anschließend für 15 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und dann für 5 min bei 1500 rpm mit 1,5 ml MACS Puffer zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in $500 \mu\text{l}$ MACS Puffer aufgenommen. Das Zellgemisch wird anschließend auf eine Säule gegeben, die einen ferromagnetischen Kern besitzt, der, platziert in ein Magnetfeld, dieses noch um ein 10000faches verstärkt. Die Säule wird als Vorbereitung einmal mit $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer gespült und erst beladen, wenn der

Puffer einmal komplett durchgelaufen ist. Beim Durchfließen der Säule werden die mit MicroBeads beladenen Zellen in der Säule zurückgehalten, wohingegen die unmarkierten Zellen beim Spülen der Säule ausgeschwemmt und im Durchfluss aufgefangen werden. Die beladene Säule wird noch dreimal mit 500 µl Macs Puffer gespült, um möglichst viele negative Zellen auszuwaschen. Entfernt man anschließend die Säule wieder aus dem Magnetfeld, erlischt die Bindung der MicroBeads an die Säule und sie können durch erneutes Spülen mit 1 ml MACS Puffer eluiert werden, der Puffer wird dabei mit einem mitgelieferten Stempel durch die Säule gedrückt. Sowohl die extrahierten, als auch die im Durchfluss enthaltenen PBMCs werden anschließend in einer Neubauer Zählkammer gezählt und $1 \cdot 10^5$ Zellen jeder Population abgenommen. Diese werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 50 µl Acidpuffer aufgenommen. Dazu werden 0,5 µl des sekundären, PE-markierten Antikörpers gegeben und das Gemisch wird für 30 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Der ungebundene Anteil der Antikörper wird dann durch zweimaliges Waschen mit 2 ml Acidpuffer und Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min entfernt und die Zellen anschließend in 100 µl Acidpuffer für die Analyse im Durchflusszytometer aufgenommen, um ihre Reinheit zu überprüfen. Bei einem positiven Ergebnis wird von den restlichen Zellen die RNA für weitere Untersuchungen extrahiert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 DNA-Extraktion aus Zellen in Suspension (mit QIAmp DNA Mini Kit von QIAGEN)

Für die Extraktion der gesamten DNA wurde das QIAmp DNA Mini Kit der Firma QIAGEN verwendet. Auch hier beruht die Aufreinigung auf der spezifischen Bindung der Nukleinsäuren an der Silicamembran der im Kit enthaltenen SpinColumns. Auf Grund des hohen Salzgehalts in den Waschpuffern und dem eingestellten, neutralen pH bleiben die Nukleinsäuren an die Membran gebunden, wohingegen Proteine und andere Kontaminanten ausgewaschen werden. Die DNA selber wird dann mit einem Puffer sehr niedrigen Salzgehaltes, es ginge auch Wasser, eluiert. Es wurde nach den Herstellervorgaben gearbeitet.

Die zuvor aus dem Vollblut isolierten Lymphozyten werden in 1xPBS gezählt und $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Extraktionsansatz eingesetzt. Diese werden zuerst mit 200 µl Lysepuffer (AL) und 20 µl Proteinase K versetzt und 15 s gevortext. Anschließend wird der Ansatz bei 56°C/10 min im Thermomixer inkubiert und kurz mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Danach werden 200 µl 100%iges Ethanol zugefügt und der Ansatz wird in kurzen Intervallen nochmals 15 s gevortext und dann kurz abzentrifugiert. Die komplette Suspension wird nach diesem Schritt auf die QIAmp Spin Column pipettiert und bei 8000 rpm für 1 Minute zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Darauf folgen zwei Waschschrte zuerst mit 500 µl AW1-Puffer, anschließend mit 500 µl AW2-Puffer. Beide Male wird die Säule zentrifugiert, beim ersten Mal 1 min bei 8000 rpm, beim zweiten Mal 3 min bei 14000 rpm und der Überstand wird verworfen. Im Anschluss wird die Säule 1 min bei 14000 rpm trocken zentrifugiert und dann wird die DNA in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube eluiert. Dazu werden 200 µl AE-Puffer auf die Säule gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, um dann bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert zu werden. Das Eluat enthält die DNA, deren Menge am Nanodrop bestimmt werden kann.

3.2.2.2 RNA-Isolation aus Zellkultur und Gewebe

Mit TRIzol Reagent

Um RNA aus Geweben oder Zellkulturzellen zu isolieren wurde für diese Arbeit mit TRIzol – einer monophasischen Lösung von Phenol und Guanidinisothiocyanat – gearbeitet. Es handelt sich um eine Weiterentwicklung der Single Step RNA-Isolationsmethode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Durch das Guanidinisothiocyanat werden während der Homogenisation die Zellen lysiert, die Zellbestandteile aufgelöst und parallel die RNasen und andere Enzyme inaktiviert. In dem zweiten Bestandteil des

Reagenz', dem Phenol, löst sich die RNA. Zusätzlich wird nach dem Homogenisieren Chloroform zugefügt, wodurch bei der anschließenden Zentrifugation eine Phasentrennung entsteht. Die Lösung wird in 3 Phasen separiert: einer wässrigen, oberen Phase in der die RNA enthalten ist; einer Interphase, in der DNA zu finden ist und einer organischen, unteren Phase, die hauptsächlich Proteine und Lipide beinhaltet. Die wässrige Phase wird abgenommen und aus ihr anschließend durch Zugabe von Isopropanol die RNA präzipitiert.

1. Schritt: Homogenisierung

Sowohl Gewebe, als auch Zellkulturzellen müssen im ersten Schritt homogenisiert werden. Dazu werden etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen mit einer 0,9 mm Kanüle in 2 ml TRIzol, bzw. 50-75 ng Gewebeprobe im TissueLyser in 1 ml TRIzol für 3 min bei 30 Hz lysiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

2. Schritt: Phasentrennung

Zu dem Lysat wird 1/5 des Volumens Chloroform gegeben und anschließend für 1-3 min gevortext, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 35000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die entstandene, obere, wässrige Phase wird in ein neues Eppendorf Tube überführt, sie enthält die RNA.

3. Schritt: RNA-Präzipitat

Die erhaltene, wässrige Phase wird 1 zu 1 mit Isopropanol versetzt und erneut gevortext. Diese Suspension wird dann wieder 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 12 min bei 35000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA wird nun, je nach enthaltener Menge, als Pellet sichtbar. Der entstandene Überstand wird abpipettiert und verworfen.

4. Schritt: Waschen

Das Pellet wird nun in 500 µl 75%igem Ethanol (in DEPC-Wasser) aufgenommen und gevortext, dann wird es für 8 min bei 35000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend auch der hier entstandene Überstand abgenommen und verworfen.

5. Schritt: Lösen der RNA:

Das RNA-Pellet wird für 3 – 5 min luftgetrocknet, bis keine Ethanolrückstände mehr sichtbar sind. Anschließend wird es in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und 30 sec. mit der Pipette vermischt. Zur vollständigen Lösung der RNA wird die Lösung daraufhin noch für 10 – 15 min bei 55 – 60°C auf dem Thermoblock inkubiert. Zum Schluss wird der RNA-Gehalt am Nanodrop bestimmt.

Die so erhaltene RNA wird im weiteren Verlauf für die Reverse Transkription eingesetzt.

Mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen

Das RNeasy Mini Kit basiert auf dem gleichen Prinzip, wie die oben beschriebene TRIzol-Chloroform-Extraktion zusätzlich kombiniert mit der selektiven Bindungsfähigkeit der Nukleinsäuren an die Silicamembran von Qiagen und der Microspinttechnologie. Der im Kit enthaltene Lyse-Puffer RLT enthält das, von Chomczynski & Sacchi (1987) beschriebene Guanidin-Thiocyanat mit seinen stark-denaturierenden Eigenschaften und seiner Fähigkeit RNAsen unverzüglich zu inaktivieren. Ein weiterer Vorteil des Kits ist die Tatsache, dass nur RNA >200 Nukleotide an der Membran angereichert und die kleineren selektiv ausgesondert werden, womit man sehr reine mRNA erhält.

Die zur Isolation verwendeten Gewebeproben sind in RNAlater bei -20°C in 2 ml Eppendorf Tube weggefroren. Für die Extraktion werden sie aufgetaut und ca. 30 mg Gewebe abgewogen und in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben. Das Gewebestück sollte möglichst wenig RNAlater an sich haften haben. In dieses Eppendorf Tube werden noch eine Metallkugel und 600 µl RLT Puffer (+ 6 µl β-Mercaptoethanol) gegeben und im TissueLyser bei 30 Hz für 3 min homogenisiert. Anschließend wird die Probe bei 10000 rpm für 3 min

zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und 1:1 mit 70%igem Ethanol versetzt. Die Suspension wird durch Pipettieren vermischt. Anschließend werden maximal 700 µl auf eine RNeasy Spin Column auf einem 2 ml Collection Tube aufgetragen und bei 10000 rpm für 15 s zentrifugiert. Wenn die Probe ein größeres Volumen als 700 µl umfasst, wird dieser Schritt wiederholt. Der Durchfluss wird verworfen und es folgen mehrere Waschschrte: zuerst mit 700 µl RW1 Puffer und anschließend mit 500 µl RPE Puffer, der Überstand wird in beiden Fällen nach der Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 s verworfen. Die Säule wird daraufhin bei 10000 rpm für 1 min getrocknet und dann auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf Tube gesetzt. Auf die Säule werden 50 µl DEPC-Wasser pipettiert und bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der aufgefangene Durchfluss enthält die extrahierte RNA, deren Gehalt mit Hilfe des Nanodrops ermittelt wird.

3.2.2.3 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Es handelt sich hier um eine Kombination zweier molekularbiologischer Methoden, der Reversen Transkription und der Polymerasen Kettenreaktion, deren Sinn in der Synthese von cDNA liegt. Als Grundlage dafür dient zuvor extrahierte mRNA, die mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in DNA umgeschrieben wird. Für diese Arbeit wurde die Two-Step RT-PCR angewendet, bei der zuerst die Reverse Transkription erfolgt und anschließend in einem gesonderten Ansatz die PCR angeschlossen wird.

Die RT-PCR beginnt mit der Inkubation der mRNA mit unspezifischen, sog. Random Primern bei 70°C für 10min, bei dem sich die mRNA linearisiert und sich die Primer anlagern (Tabelle 7).

Reagenz	Menge pro Ansatz
RNA	x µl (1 ng)
Random Primer	1,0 µl
Aqua bidest	x µl (auf 10µl auffüllen)
Summe	10,0 µl

Tabelle 7: Pipettierschema Mix1, RT-PCR

Im Anschluss wird zu diesem Mix 1 der Mix 2 (Tabelle 8) hinzugegeben, dabei wird die AMV als letztes zum gesamten Ansatz pipettiert.

Reagenz	Menge pro Ansatz
5x AMV-Puffer	4,0 µl
Aqua bidest	2,0 µl
dNTP's (10mM)	2,0 µl
RNasin	0,5 µl
Summe	8,5 µl

Tabelle 8: Pipettierschema Mix 2, RT-PCR

Dieser Ansatz wird dann für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bei dem sich die AMV-Transkriptase an die an der RNA gebundenen Primer anlagert. Darauf folgt ein weiterer Inkubationsschritt bei 42°C für 60min bei dem die Synthese der cDNA stattfindet und die RNA im Anschluss durch die im Mix 2 enthaltene RNase abgebaut wird. Die ganze Reaktion wird gestoppt durch einen Inkubationsschritt von 5 min für 95°C und anschließenden 5 min für 0-5°C. Am Ende wird die entstandene cDNA noch 1:5 mit Aqua bidest verdünnt.

Es folgt der zweite Schritt, die Polymerase Kettenreaktion entsprechend dem in 1.3.3 beschriebenen Versuchsablauf (Tabelle 9).

Reagenz	Konzentration in Endlösung	Menge in μl
Aqua bidest		15,175
DreamTaq-Puffer (10x inkl. 20mM MgCl_2)	2,0mM	2,5
Primer forward (10 pmol/ μl); <i>GAPDH 440</i>	0,4 μM	1,0
Primer reverse (10 pmol/ μl), <i>GAPDH 441</i>	0,4 μM	1,0
dNTP-Mix (100 mM)	1,0mM	0,2
DreamTaq Polymerase (5,0 U/ μl)	0,625U	0,125
cDNA-Template (~0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1,0 μg	5,0
PCR Volumen		25,0

Tabelle 9: GAPDH-PCR mit Taq-Polymerase, Quelle: Pipettierschema von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase für 25 μl

Diesmal erfolgt die DNA-Amplifikation mit Hilfe von spezifischen Primern. Für den Ansatz wurde mit dem Primerpaar für die equine GAPDH, einem Housekeeping-Gen, dass in jedem Gewebe exprimiert wird und dessen Nachweis für eine erfolgreiche Reverse Transkription steht, gearbeitet. Das Cyclyer-Programm ist angelehnt an das der Taq-Polymerase, allerdings mit einer geringeren Zykluszahl, um quantitative Unterschiede im DNA-Gehalt zu detektieren, abhängig von der Intensität der Bande (Tabelle 10).

Zyklus	Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer in Sekunden
Initiale Denaturierung	1	95	120
Denaturierung	2	95	30
Annealing	3	60	30
Extension 1	4	72	60
Finale Extension	5	72	600
Pause/Kühlung	6	15	∞
<i>Schritt 2-4 für 30 Zyklen</i>			

Tabelle 10: PCR-Cyclyer Programmierung für Taq-Polymerase; Quelle: Cyclyer-Protokoll von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase

3.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Agarose-Gelelektrophorese werden DNA- oder RNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt, sodass eine genaue Identifizierung möglich wird. Dazu werden die Proben auf ein Gel als Trägermedium aufgetragen, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Durch Anlegen einer Spannung beginnen die Moleküle dann sich ihrer Ladung entsprechend durch das Gel zu bewegen. Auf Grund ihrer negativen Ladung wandert die DNA in diesem Gleichspannungsfeld von der Kathode zur Anode und wird, durch die im Gel vorhandenen Poren, der Größe nach aufgetrennt. Je höher dabei die Agarosekonzentration des Gels ist, umso kleiner sind die entstandenen Poren und umso klarer lassen sich Fragmente mit ähnlicher Größe gegeneinander auftrennen.

Bei dieser Arbeit wurden die Proben (PCR-Produkte, Restriktionsverdau) mit einem 6-fach-Loading Dye 1:6 vermischt und auf ein 1 – 2%iges Agarosegel aufgetragen, das in einer Gelkammer gefüllt mit 1%igem TAE-Puffer lag und an das eine Spannung von 50 – 120 V

angelegt wurde. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente lief ein 100bp-Marker, bzw. ein 1kb-Marker als Vergleich parallel zu jeder Probe auf dem Gel mit.

3.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (kurz PCR) ist eine der wichtigsten molekularbiologischen Arbeitsmethoden. Bei diesem Verfahren wird ein thermostabiles Enzym dazu genutzt, den physiologisch vorkommenden Schritt der Replikation *in vitro* mehrfach zu wiederholen, um spezifische Gen-Sequenzen innerhalb einer vorliegenden DNA-Kette zu vervielfältigen. Nach einer initialen Denaturierungsphase laufen drei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte in einer Schleife von 20 – 40 Zyklen ab, an deren Ende eine finale Elongationsphase steht. Bei dem ersten Schritt, der Denaturierung der DNA-Doppelhelix, werden bei Temperaturen von 94 – 96°C die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen aufgespalten, sodass man zwei Einzelstränge erhält. An diese lagern sich bei dem anschließenden Primer-Annealing, bei Temperaturen von 50 – 70°C, die für den gesuchten Genom-Abschnitt spezifischen, komplementären Primer an das 3'-Ende des Einzelstranges an und bilden so die Bindungsstelle für die Polymerase. Durch die DNA-Polymerase erfolgt dann im letzten Schritt die Synthese des neuen Komplementärstranges. Dieser Schritt erfolgt in der Regel bei 72°C, dem Temperaturoptimum des hitzestabilen Enzyms, und wird als Amplifikation bezeichnet. Bei jedem Zyklus werden so neue, zum gesuchten Genabschnitt identische DNA-Moleküle erzeugt, die im darauffolgenden Zyklus als Matrizenstrang dienen. So kommt es bei der PCR zum exponentiellen Anstieg des fraglichen Gen-Segments, bei n Zyklen werden dann 2^n neue DNA-Moleküle amplifiziert.

Bei den hier durchgeführten Polymerase-Kettenreaktionen kamen zwei verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz, zum einen die Taq-Polymerase aus dem *Thermus aquaticus* für Expressionsstudien und zum anderen die EasyA-Polymerase für die zur Klonierung weiter verwendeten PCR-Produkte. Die EasyA besitzt eine geringere Fehlerquote beim proof-reading (1 von 1000 Basen) als die Taq-Polymerase (6 von 1000 Basen), weshalb sie für weiter zu benutzende Produkte verwendet wurde. Die PCR wurde nach dem Protokoll in Tabelle 11 für die Taq-Polymerase und nach dem Protokoll in Tabelle 12 für die EasyA Polymerase ein 0,2 ml PCR Tubes pipettiert.

Reagenz	Konzentration in Endlösung	Menge in μ l
Aqua bidest		15,175
DreamTaq-Puffer (10x inkl. 20mM MgCl ₂)	2,0 mM	2,5
Primer forward (10 pmol/ μ l)	0,4 μ M	1,0
Primer reverse (10 pmol/ μ l)	0,4 μ M	1,0
dNTP-Mix (100 mM)	1,0 mM	0,2
DreamTaq Polymerase (5,0 U/ μ l)	0,625 U	0,125
cDNA-Template (~0,2 μ g/ μ l)	1,0 μ g	5,0
PCR Volumen		25,0

Tabelle 11: PCR-Ansatz Taq-Polymerase; Quelle: Pipettierschema von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase für 25 μ l

Reagenz	Konzentration in Endlösung	Menge in μ l
Aqua bidest		20,2
EasyA-Puffer(10x inkl. 20 mM MgCl ₂)	2,0 mM	2,5
Primer forward (10 pmol/ μ l)	0,4 μ M	1,0
Primer reverse (10 pmol/ μ l)	0,4 μ M	1,0
dNTP-Mix (100 mM)	0,5 mM	0,1
EasyA-Polymerase (5,0 U/ μ l)	2,5 U	0,5
cDNA-Template (~0,2 μ g/ μ l)	~0,2 μ g	1,0
PCR Volumen		25,0

Tabelle 12: PCR-Ansatz EasyA-Polymerase *Quelle:* Pipettierschema von Agilent für EasyA Polymerase für 25 μ l

Anschließend wurden die Ansätze in den Thermocycler gestellt und bei dem Programm in Tabelle 13 für die Taq-Polymerase und in Tabelle 14 für die EasyA-Polymerase synthetisiert.

Zyklus	Schritt	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden
Initiale Denaturierung	1	95	120
Denaturierung	2	95	30
Annealing	3	56-63	30
Extension 1	4	72	60
Finale Extension	5	72	600
Pause/Kühlung	6	15	∞
<i>Schritt 2-4 für 35 Zyklen</i>			

Tabelle 13: PCR-Cycler Programmierung für Taq-Polymerase *Quelle:* Cycler-Protokoll von ThermoScientific für DreamTaq Polymerase

Zyklus	Schritt	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden
Initiale Denaturierung	1	95	120
Denaturierung	2	95	40
Annealing	3	56-63	30
Extension 1	4	72	60
Finale Extension	5	72	420
Pause/Kühlung	6	15	∞
<i>Schritt 2-4 für 35 Zyklen</i>			

Tabelle 14: PCR-Cycler Programm für EasyA-Polymerase *Quelle:* Cycler-Protokoll von Agilent für EasyA Polymerase

3.2.2.6 DNA-Gelextraktion (mit QIAquick Gel Extraktion Kits)

Um fragliche Banden nach der Gelelektrophorese genauer untersuchen zu können (Sequenzierung) oder weiterzuverwenden (Klonierung), kommt diese molekularbiologische Technik zum Einsatz. Dabei wird das zuvor über einem UV-Transluminator mit einem Skalpell ausgeschnittene DNA-Fragment aus dem Agarosegel isoliert. Hier wurde das oben genannte Kit der Firma QIAGEN verwendet. Das Prinzip der Extraktion beruht hierbei auf der Bindung der DNA an die Silica-Membran der enthaltenen Säule, abhängig vom Salzgehalt des verwendeten Puffers. Dadurch können mögliche Verunreinigungen von Proteinen und ähnlichem ausgewaschen werden, ohne dass die DNA verloren geht. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Gelstücke werden gewogen und mit dem 3fachen des Gewichts an QG-Puffer versetzt. In diesem werden sie bei 50°C für etwa 10 Minuten inkubiert, bis sich das Gel vollständig gelöst hat. Diese Suspension wird dann mit dem 1fachen des Gelgewichts an Isopropanol versetzt und auf die Säule aufgetragen. Durch den hohen Salzgehalt des QG-Puffers wird der DNA die Hydrathülle entzogen und so die Bindungsbedingungen für die Kieselgelmembran der Säule geschaffen. Die Säule wird dann für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Durch nochmaliges Behandeln der Säule mit 500 µl QG-Puffer werden die letzten Reste Agarose gelöst und durch Zentrifugieren aus der Membran entfernt. Anschließend werden die Salze mit 750 µl PE-Puffer ausgewaschen und die Säule unter oben genannten Bedingungen trocken zentrifugiert. Danach kann die DNA mit 30 µl des EB-Puffers in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube eluiert und deren Gehalt am Nanodrop bestimmt werden.

3.2.2.7 Klonierung mit dem PCR Cloning Kit™ von StrataClone

Mit dem Kit von StrataClone werden die Schritte von der Ligation und der Transformation zusammengefasst, ein vorheriger Verdau des Vektors und der DNA Fragmente ist nicht nötig. Es ist optimiert für PCR-Produkte, die durch die EasyA-Polymerase amplifiziert wurden. Der Vektor Mix von diesem Kit beinhaltet zwei DNA-Stränge, jeweils an einem Ende beladen mit der Topoisomerase I und einem Uridin-Überhang, sowie einer loxP Erkennungssequenz am anderen Ende. EasyA-Amplifikate mit einem Adenosin-Überhang am 3'-Ende werden nun in einer Ligationsreaktion beginnend mit einer Basenpaarung von A-U, gefolgt von einer Topoisomerase vermittelten Strang-Ligation miteinander verknüpft. Nach der anschließenden Transformation in die, im Kit enthaltenen, das Enzym Cre Rekombinase exprimierenden, kompetenten Zellen wird nun aus dem vorher entstandenen linearen Molekül „Vektorarm^{ORI}-PCR-Produkt-Vektorarm^{amp/kan}“ ein zirkuläres DNA-Molekül, der pSC-A-amp/kan-Vektor. Diese Verbindung wird durch das exprimierte Enzym ermöglicht, was die Verknüpfung zweier loxP Erkennungssequenzen katalysiert, die Cre Rekombinase (Abb. 10).

Als erster Schritt werden die Reagenzien für die Ligation pipettiert (siehe Tab.15) und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Anschließend wird der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach dieser Zeit auf Eis gestellt.

Reagenz	Menge pro Ansatz
StrataClone Cloning Puffer	1,5 µl
PCR Produkt (5 – 50 ng)	1,0 µl
StrataClone Vector Mix	0,5 µl
Summe	2,0 µl

Tabelle 15: Ansatz Ligation, StrataClone PCR Cloning Kit

Der zweite Schritt, die Transformation, beginnt mit dem Mischen von 1 µl des Ligationsansatzes und 25 µl der zuvor aufgetauten, kompetenten Zellen. Diese werden dann für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s bei 42°C im Wasserbad hitzegeschockt, um dann wieder für 2 min auf Eis gestellt zu werden. Nach diesem Schritt

wird zu dem Ansatz bereits vorgewärmtes LB-Medium pipettiert (125 µl) und dieser Ansatz dann für mindestens 1 h bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert. Nach dieser Zeit kann der komplette Ansatz auf einer Agarplatte mit Ampicillinresistenz ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert werden. Die entstandenen Kolonien werden gepickt und die Plasmid-DNA mit Hilfe der Miniprep- oder Midiprep-Methode extrahiert.

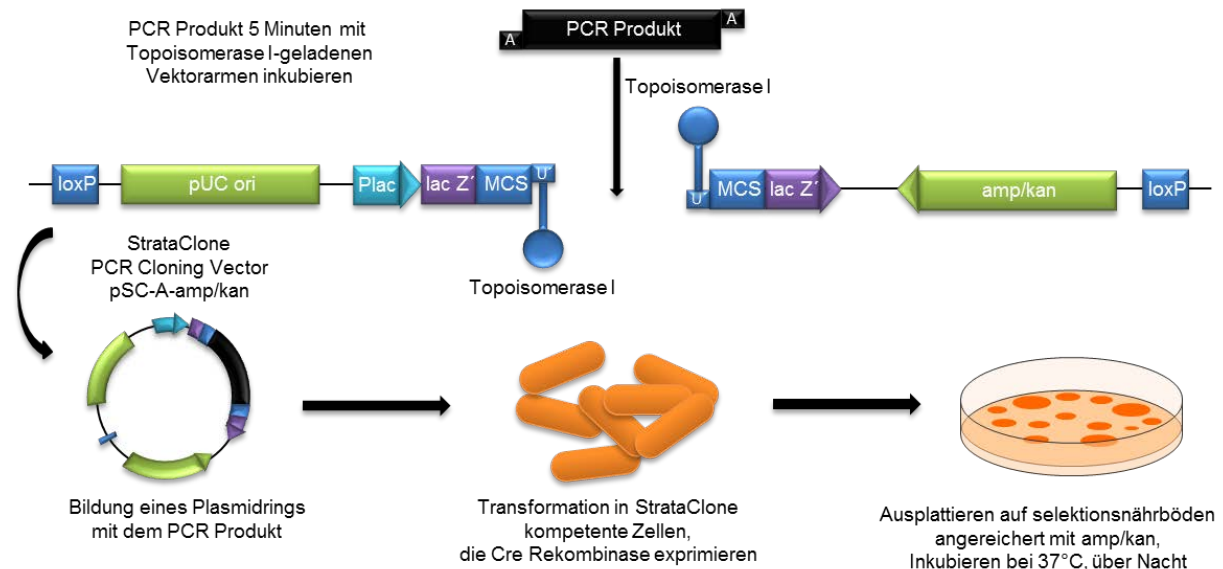


Abb. 10: Funktionsweise der Klonierung mittels dem StrataClone Cloning Kit (Quelle: StrataClone PCR Cloning Kit- INSTRUCTION MANUAL; Catalog #240205; Revision B.02).

3.2.2.8 Miniprep (mit QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN)

Die Miniprep ist eine Möglichkeit Plasmid DNA aus Bakterien zu extrahieren und anschließend über Säulen aufzureinigen. Sie gehört in die Gruppe der Plasmidpreparationsverfahren. Grob kann man diese Verfahren in 3 Schritte einteilen, die Anzucht von einer Bakterienkultur, die das gewünschte Plasmid trägt, die abschließende Ernte und Lyse dieser Bakterien, um das Plasmid freizulegen und die anschließende Aufreinigung der so gewonnenen Plasmid DNA.

Um kleinere Mengen Plasmid DNA zu isolieren, kommt die sogenannte Miniprep zum Einsatz (für Mengen bis 50-100 µg DNA). Hierfür wurde das Spin Miniprep Kit von QIAGEN verwendet, welches auf dem modifizierten Prinzip der alkalischen Lysierungsmethode der Wissenschaftler Birnboim und Doly basiert. Bei der Lyse unter alkalischen Bedingungen (pH 12,0-12,5) werden sowohl die chromosomale DNA, als auch die Proteine der Bakterien denaturiert, die DNA der Plasmide bleibt jedoch stabil. Um auch die ansonsten störende RNA zu degradieren, setzt man dem Lysepuffer hier RNase zu. Die so gewonnene Plasmid DNA wird dann zur weiteren Aufreinigung auf eine Silica-Gel-Membran aufgetragen, von der sie selektiv absorbiert wird.

Das Verfahren nach QIAGEN ist einfach. Von einer Über-Nacht-Kultur von 4 ml LB-Medium mit dem Zusatz von 4 µl Selektionsantibiotikum (Ampicillin 1:1000) werden etwa 1,5 ml in ein entsprechendes Eppendorf Tube überführt und bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wird dann in 250 µl P1- Puffer des Kits aufgenommen und anschließend nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 lysiert. Man erhält eine visköse, bläulich gefärbte Lösung. Durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 wird das Lysat dann schlussendlich neutralisiert und an die, für die Bindung an die Membran essentiellen, hohen Salzgehalte angepasst. Die Lösung entfärbt sich wieder und wird wolkig. Dieses Gemisch wird dann bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert und der entstandene Überstand mit einer Pipette abgenommen und auf die QIAprep Spin Column gegeben. Im Anschluss wird die Säule dann wieder bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule trägt

nun die Plasmid DNA, welche im nachfolgenden Schritt mit 500 µl PB-Puffer gewaschen wird, welcher die möglicherweise vorhandene, restliche Nukleaseaktivität stoppt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 1 min, bei dem der Durchfluss verworfen wird, wird die Säule nochmals gewaschen, diesmal mit 750 µl PE-Puffer, und anschließend wieder bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Auch dieses Mal wird der Durchfluss verworfen und die Säule wird daraufhin noch einmal bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert, um auch die letzten Reste des Waschpuffers zu entfernen.

Nach diesem Schritt wird die Säule auf ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Tube platziert und es werden 50 µl Eluierungspuffer EB auf die Säule gegeben. Dieser Puffer zeichnet sich durch einen niedrigen Salzgehalt aus, welcher benötigt wird, um die Plasmid DNA wieder aus der Membran zu lösen. Nachdem die Säule mit dem EB-Puffer für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, wird sie noch einmal bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss in einem 1,5 ml Eppendorf Tube aufgefangen. Die Säule wird im Anschluss verworfen und der DNA-Gehalt des Durchflusses wird am Nanodrop bestimmt.

3.2.2.9 Midiprep (NucleoBond Xtra Midi Plus Kit von Macherey-Nagel)

Wie auch bei der Miniprep handelt es sich hier um eine Methode zur Plasmidpreparation, mit dem Unterschied, dass eine größere Kultur an Bakterien eingesetzt wird. Das führt dann im Endeffekt auch zu einer größeren Menge Plasmid-DNA (100 – 350 µg). Auch für dieses Verfahren wurde ein kommerzielles Kit verwendet, diesmal das oben genannte Midi Plus Kit von Macherey-Nagel.

Im Gegensatz zur Miniprep wurde eine Vorkultur des speziellen Bakterienklons in 4 ml LB-Medium mit 4 µl Antibiotikum (Ampicillin 1:1000) angesetzt. Diese Vorkultur wurde für 6 – 8 Stunden im 37°C Schüttler inkubiert, davon wurden dann 100 µl in 100 ml LB-Medium mit 100 µl Antibiotikum (Ampicillin 1:1000) überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wird die Kultur auf zwei 50 ml Falcons aufgeteilt und bei 4°C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das so erhaltene Pellet wird dann in 8 ml Resuspensions Puffer (RES) aufgenommen, indem zuerst das Pellet in dem ersten Falcon gelöst und die gesamte Suspension in das zweite Falcon überführt wird. Der RES Puffer enthält zusätzlich RNase A. Anschließend werden 8 ml Lysis Puffer (LYS) zu der Suspension gegeben und vorsichtig, durch drehen des Falcons etwa fünfmal, vermischt. Anschließend wird die Suspension für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, durch diesen Prozess wird die Plasmid DNA freigelegt. In der Zwischenzeit erfolgt die Vorbereitung der Säule, sie wird auf einem Ständer platziert, bei dem es möglich ist den Durchfluss aufzufangen. Anschließend werden 12 ml Equilibrierungs-Puffer (EQU) kreisförmig auf den Rand der Säule pipettiert, um die Säule zu befeuchten. Nach der Inkubation werden 8 ml Neutralisations-Puffer (NEU) zu der Suspension gegeben und durch Drehen des Falcons wird beides miteinander vermischt. Dieses Gemisch wird daraufhin ohne weitere Inkubationszeit auf den Filter der Säule gegeben. Anschließend folgt ein Waschschrift des Filters und der Säule mit 5 ml EQU-Puffer. Nach diesem Schritt wird der Filter entfernt und die Säule mit dem Waschpuffer (WASH) nochmals gewaschen. Anschließend folgt die Eluierung. Dazu wird die Säule auf ein sauberes 15 ml Falcon gesetzt und mit 8 ml Eluierungspuffer (ELU) ausgewaschen. Der Durchfluss wird in dem Falcon aufgefangen und die Säule im Anschluss verworfen. Um die DNA auszufällen, werden zu dem Durchfluss 3,5 ml Isopropanol gegeben, mit der Pipette gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Suspension wird anschließend in die mitgelieferte 50 ml Spritze nach Entfernen des Kolbens gefüllt und dann durch den Finalizer gedrückt. In diesem bleibt die gewünschte Plasmid-DNA nun hängen und der überflüssige Puffer wird verworfen. Der Kolben wird nach diesem Schritt wieder aus der Spritze entfernt, zuvor wird jedoch auch der Finalizer abgenommen. Nachdem der Finalizer dann wieder auf die leere Spritze gesetzt wurde, werden in die Spritze 2 ml 70%iges Ethanol gegeben und durch den Finalizer gedrückt. Danach wird der Finalizer getrocknet, indem er von der Spritze abgenommen, Luft in die Spritze gesogen und durch den wieder aufgesetzten Finalizer gepresst wird. Dieser Vorgang

wird dreimal wiederholt und im Anschluss wird der Finalizer auf eine 1 ml Spritze gesetzt in der 500 µl Tris-Puffer sind, welche dann durch den Finalizer gedrückt werden. Der Durchfluss wird in einem 1,5 ml Eppendorf Tube aufgefangen. In ihm befindet sich die eluierte Plasmid-DNA. Der DNA-Gehalt wird dann am Nanodrop bestimmt.

3.2.2.10 Sequenzierung

Die amplifizierten PCR-Produkte und synthetisierten Plasmide werden mit Hilfe der Sequenzierung überprüft. Diese Methode wird mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt, die auf einer fluoreszenzbasierten Variation der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al* (1977) beruht. Dabei handelt es sich um eine enzymatisch-gekoppelte Kettenabbruch-Synthese, bei der je ein Teil der 4 Basen (Adenin, Tyrosin, Guanin, Cytosin) nicht als Diphosphat, sondern als Triphosphat vorliegen, sogenannte Kettenabbruch-ddNTPs. Diese besitzen an ihrem 3'-Ende keine Hydroxygruppe, wodurch in dem neusynthetisierten Strang nach ihrem Einbau keine Verlängerung durch die DNA-Polymerase mehr möglich ist, da am 3'-C-Atom die OH-Gruppe für die Verbindung mit der Phosphatgruppe vom folgenden Nukleotid fehlt und es zum Kettenabbruch kommt. Die Folge sind DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, über die die Sequenz ermittelt wird. Die in dem Sequencing Kit enthaltenen Desoxyribonukleotidtriphosphate sind mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Sequenzierreaktion ist eine Variation der Polymerase-Kettenreaktion, bei der nur ein spezifischer Primer für die Sequenz eingesetzt wird. Dadurch wird die DNA nur linear amplifiziert, der Gegenstrang wird in einem zweiten Ansatz parallel synthetisiert (Protokoll siehe Tab. 16 und 17).

Reagenz	Menge in µl
BigDye 5xSequenz Puffer	1,5
Primer (2,5 pmol)	1,0
BigDye	1,0
DNA Template (PCR Produkt 1-50 ng Miniprep bis 100 ng Midiprep bis 200 ng)	X
Aqua bidest	auf 10 µl auffüllen
PCR Volumen	10,0

Tabelle 16: Protokoll Sequenz-PCR; Quelle: Applied Biosystems; leicht abgewandelt von AG Meyers (Kooperierende Arbeitsgruppe)

Zyklus	Schritt	Temperatur in °C	Dauer in Minuten
Denaturierung	1	96	1,00
Denaturierung	2	96	0,10
Annealing	3	50	0,05
Extension	4	60	2,00
Pause/Kühlung	5	15	∞
<i>Schritt 2 – 4 in 25 Zyklen</i>			

Tabelle 17: Cycler Programm für die Sequenzierungs-PCR, Quelle: Applied Biosystems, leicht abgewandelt von AG Meyers (Kooperierende Arbeitsgruppe)

Die entstandenen PCR-Produkte werden mittels einer Ethanol-fällung aufgereinigt. Dazu werden sie mit 25 µl 100%igem Ethanol versetzt und 1 µl 3M Natriumacetat (pH 5,5) für 10 min bei 4°C im Kühlschrank gefällt und anschließend bei 14000 rpm für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird mit Hilfe der Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet anschließend noch 2-mal mit 150 µl 75%igem Ethanol gewaschen und bei 14000 rpm für 5 Min zentrifugiert, auch hier wird der Überstand abgesaugt. Als letzter Schritt wird das Pellet für 5 min in der Speed Vac getrocknet und dann in 20 µl HiDi-Formamid gelöst.

Die Auftrennung der aufgereinigten Kettenabbruchprodukte passiert über Kapillarelektrophorese und durch einen Laser werden die ddNTPs der Fragmentenden zur Fluoreszenz in ihrer spezifischen Wellenlänge angeregt und von einem Detektor erkannt. Anhand des entstandenen Elektropherogramms kann direkt die Sequenz des DNA-Stranges abgelesen werden.

3.2.2.11 Transformation ohne Kit

Die herkömmliche Transformation besteht aus 3 Teilschritten, dem Restriktionsverdau, der Ligation und der Transformation der Bakterien. Diese Methode wird hier durchgeführt, um Konstrukte der CEACAMs zu erschaffen, an denen ein zu detektierendes Molekül hängt. So kann überprüft werden, ob die löslichen Mitglieder wirklich exprimiert, also in den Überstand der Zellkultur abgegeben werden, bzw. ob die membranverankerten Mitglieder an der Zelloberfläche erscheinen. Für die exprimierten CEACAM-Mitglieder wird der pEGFP-N3-Vektor verwendet und für die membranverankerten der pFLAG-CMV3 (siehe Abb. 11).

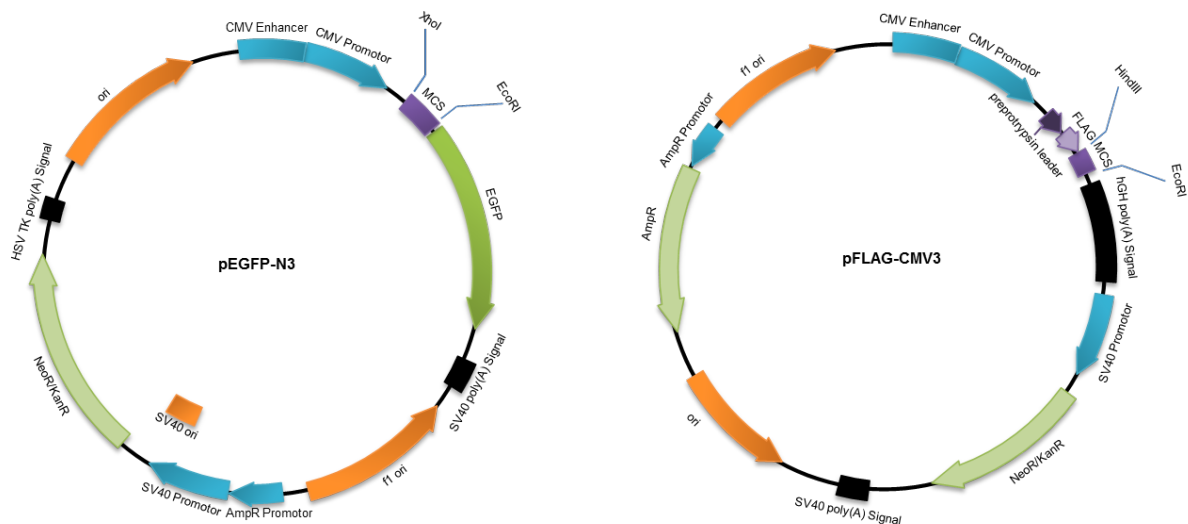


Abbildung 11: Für die Expressionsstudien eingesetzte, kommerzielle Vektoren. (nach Vektorkarten von snappene.com) Für die Expression der sezernierten oder potentiell sezernierbaren Mitglieder der CEA-Genfamilie wurde der pEGFP-N3 Vektor verwendet, da dieser ein GFP an das Ende des zu untersuchenden Proteins hängt und auf Grund der GFP-eigenen Fluoreszenz das Protein sowohl in der Zelle nachverfolgt, als auch außerhalb ohne spezifische Antikörper für das fragliche Protein selbst über das GFP analysiert werden kann. Für die Expression der membranverankerten Mitglieder wurde der pFLAG-CMV-3 Vektor eingesetzt, da durch ihn der extrazelluläre Teil mit einem CMV beginnt und dadurch das Protein detektierbar wird.

3.2.2.12 Präparativer Restriktionsverdau von Plasmid und Insert

Der präparative Restriktionsverdau dient dazu, DNA-Moleküle (hier Plasmid und Insert) gezielt an einer bestimmten Position zu spalten und die beiden Komponenten so zueinander passend zuzuschneiden. Diese Reaktion wird von Enzymen bakteriellen Ursprungs, sogenannten Restriktionsendonukleasen, katalysiert. Sie erkennen eine spezifische,

palindromische Sequenz von 6 – 8 Basenpaaren, die sie an einer definierten Stelle aufspalten (Bsp. EcoRI: G'AATTC; Spaltung hinter G). Für den Versuch wird ein Ansatz mit 2 Restriktionsenzymen à 20 µl für das zu schneidende Plasmid und ein 30 µl Ansatz für das PCR-Produkt gemacht (Pipettierschema siehe Tab. 18). Zur Überprüfung der Funktionalität der Enzyme wird zusätzlich je ein Ansatz pro Enzym mit dem Plasmid gemacht.

Reagenz	Menge pro Ansatz (Plasmid)	Menge pro Ansatz (Insert)
Aqua bidest	x µl (auf 20 µl auffüllen)	x µl (auf 30 µl auffüllen)
10xFastDigest Green Buffer	2,0 µl	2,0 µl
Plasmid	x µl (500-1000 ng)	10 µl (~ 0,2 µg)
Enzym 1	1,0 µl	1,0 µl
Enzym 2	1,0 µl	1,0 µl
FastAP	1,0 µl	-----
Summe	20,0 µl	30,0 µl

Tabelle 18: Pipettierschema für den Restriktionsverdau, *Quelle:* Thermo Scientific

Die alkalische Phosphatase (FastAP) wird dem Plasmid-Ansatz hinzugefügt, um die entstandenen „sticky ends“ zu dephosphorylieren und das Plasmid so in linearer Form zu belassen. Der Ansatz wird dann bei 37°C für mindestens 30-60 min mit dem Thermomixer inkubiert und anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die entstandenen Banden wurden ausgeschnitten, via Gelextraktion aus dem Gel gelöst und dann in der Ligation verknüpft.

3.2.2.13 Ligation

Um das geschnittene DNA-Fragment und das dazu kovalent geschnittene Plasmid aus dem Restriktionsverdau zu rekombinieren, wird die Ligation durchgeführt. Dabei erleichtert die T4 Ligase die Verbindung der beiden kohäsiven „sticky ends“ des Plasmids und des DNA-Fragments. Die Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den 3'Hydroxylenden von dem Akzeptor mit den 5'Phosphatenden eines Donors, in diesem Fall die jeweiligen Enden des Fragments und des Plasmids. Man erhält dadurch ein rekombinantes Plasmid, welches unter anderem die gewünschte DNA-Sequenz enthält. Dazu wird die Plasmid-DNA und die einzufügende DNA-Sequenz im Verhältnis 1:3 in die Ligation eingesetzt und zusammen mit der T4-Ligase nach dem Protokoll der Tabelle 19 zusammen pipettiert. Hier werden 50 ng Plasmid pro Ansatz eingesetzt. Wieviel ng Insert man benötigt, hängt von der Größe des Vektors ab und kann mit Hilfe von dem Ligation Calculator der Uni Düsseldorf berechnet werden (http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html).

Reagenz	Menge pro Ansatz
5x Ligationspuffer	4,0 µl
T4 Ligase	1,0 µl
Vektor (50 ng)	x µl
Insert	errechnete Menge
Aqua bidest	x µl (auf 20 µl auffüllen)
Summe	20,0 µl

Tabelle 19: Pipettierschema für die Ligation mit der T4 Ligase; *Quelle:* Thermo Scientific

Anschließend wird der Ansatz für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.2.2.14 Transformation

Die Transformation ist der letzte Teilschritt der Klonierung. Dabei wird die zuvor hergestellte, rekombinante DNA, normalerweise in Form eines Plasmids, auf einem nicht-viralen Weg in kompetente Bakterienzellen übertragen. Hier wurde dafür der E.coli-Stamm XL-1 verwendet. Da Escherichia coli keine natürliche Kompetenz besitzen, mussten sie zuvor chemisch kompetent gemacht werden (stand im Labor zur Verfügung). Der gesamte Ansatz der Ligation wird 30 min auf Eis zusammen mit 50 µl kompetenter XL-1 inkubiert, dabei wird die DNA in die Bakterienzellen aufgenommen. Anschließend werden die Zellen bei 42°C für 1 min hitzegeschockt, um danach noch einmal für 2 min auf Eis zu kühlen. Nach diesem Schritt werden 200 µl LB-Medium zu der Suspension pipettiert und der gesamte Ansatz dann bei 37°C auf dem Thermomixer für 1h inkubiert. Nach der letzten Inkubation werden die Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen, die mit einem Antibiotikum versetzt wurde, welches den Bakterien, die das gewünschte Plasmid tragen, ein selektives Wachstum ermöglicht. Diese Selektion wird durch die Resistenz, die zusätzlich zu der gewünschten DNA-Sequenz, auf dem Plasmid enthalten ist, ermöglicht. Die Agarplatte wird dann bei 37°C über Nacht in einem Brutschrank inkubiert.

3.2.2.15 Analytischer Restriktionsverdau

Das Prinzip dieses Verdau ist das gleiche, wie vom präparativen Restriktionsverdau. Er wird durchgeführt, um die rekombinanten Plasmide zu überprüfen. Das Ausgangsmaterial bilden die bei der Miniprep extrahierten klonierten Plasmide. Der Ansatz entspricht dem des präparativen Restriktionsverdau für Plasmide.

3.2.3 Statistische Methoden

Die Sequenzanalysen wurden mit Hilfe von BLAST vom National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt. Dabei konnte jedoch nur überprüft werden, ob es sich bei der erhaltenen Sequenz um den Abschnitt handelt, der ein mögliches Mitglied der equinen CEA-Familie trägt.

Mit dem Codon Aligner wurde im Anschluss überprüft, wie gut die Sequenz ausgelesen werden konnte, um danach mit dem Multiple Sequence Alignment von CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) die Übereinstimmung der vorhergesagten und der erhaltenen Sequenz zu ermitteln.

Sequenzen auf dem Gegenstrang wurden dazu mit Hilfe des Reverse complement tools (<http://reverse-complement.com/>) in ihre 3´-5´-Leserichtung übersetzt.

Abschließend wurde mit Hilfe des ExpASY Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) die Übersetzung in die Aminosäuresequenz durchgeführt, wodurch ermittelt werden konnte, ob die Sequenz ein potentiell funktionierendes Protein verschlüsselt.

4 Ergebnisse

4.1 Die konservierten Mitglieder der CEA Genfamilie

Im publizierten Genom des Pferdes, zugänglich auf NCBI, whole-genom shotgun contigs (wgs) „Equus caballus (taxid:9796)“, wurden Hinweise für die Existenz von zwei der vier konservierten CEACAM Gene gefunden. Ausgehend von diesen Hinweisen wurden über Ähnlichkeiten zu anderen Tierarten Strukturvorhersagen getroffen und auf Grund dieser Vorhersagen Primer zur Amplifikation der DNA mittels PCR entworfen. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Größe des Amplifikats inklusive Intron 2500 bp nicht übersteigt. Die entsprechenden Primersequenzen können der Primerliste im Methodenteil entnommen werden.

4.1.1 CEACAM16

Mittels einer PCR mit der DreamTaq Polymerase erfolgte die Identifikation des CEACAM16 Gens in der isolierten genomischen DNA-Probe von einem weiblichen Trakehner. Da das CEACAM16 in anderen Spezies, wie der Maus, der Ratte und dem Menschen spezifisch im Innenohr zu finden war (Zebhauser *et al*, 2005), wurde zuerst die genomische Existenz im Pferd überprüft (Abb.12A). Gleichzeitig konnte so die Spezifität und Funktionalität des Primerpaares überprüft werden.

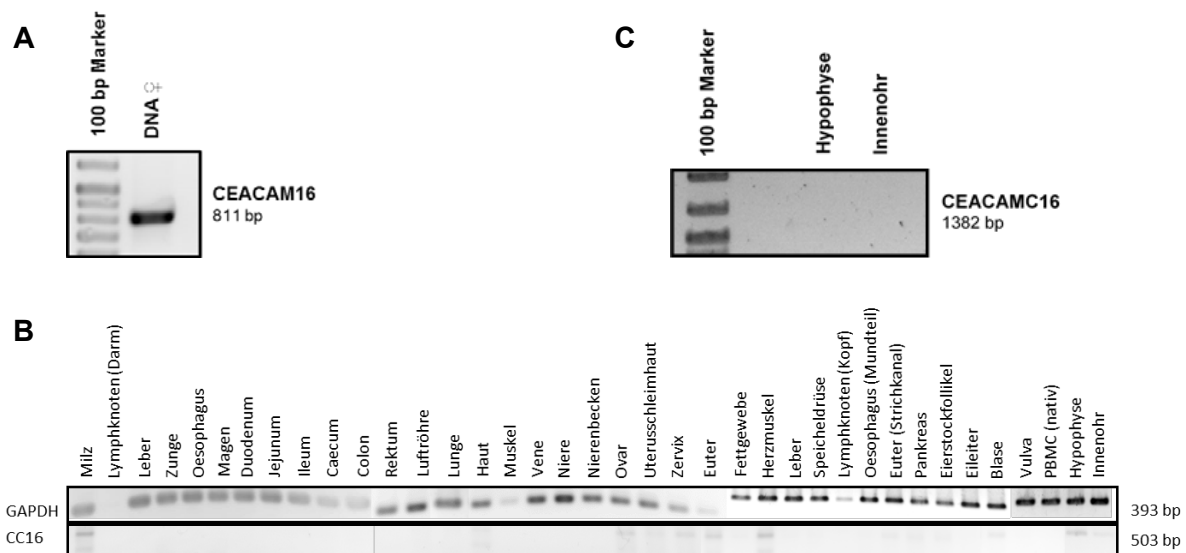


Abb. 12. Nachweis des CEACAM16 Gens und dessen Expression im Pferd. **A:** mit Hilfe von spezifischen Primern, die komplementär zu Sequenzen des Leader- und der N-Domänen Exons des CEACAM16 Gens waren, wurde ein Teil des CEACAM16 Gens amplifiziert. Als Template wurde genomische DNA aus Granulozyten verwendet. Die erwartete Größe des Produktes waren 811 Basenpaare. **B:** Mit den Primern deren Funktionalität in A gezeigt ist wurden dann mittels RT-PCR Expressionsstudien in verschiedenen Geweben durchgeführt. Die erwartete Größe (ohne Intron) sollte 503 bp betragen. In keinem der Gewebeproben konnte der eindeutige Nachweis einer Expression erbracht werden. Spezifische mRNA für das *house keeping* Gen GAPDH konnte bis auf wenige Ausnahmen in allen Geweben nachgewiesen werden. **C:** mit Hilfe von spezifischen Primern für die gesamte mRNA Sequenz des CEACAM16 wurden die beiden Gewebe Innenohr und Hypophyse auf das Vorhandensein des Gens überprüft. Es konnte jedoch nichts amplifiziert werden.

Die entstandene Bande auf der erwarteten Höhe von 811 bp wurde über der UV-Bank ausgeschnitten und mittels Gelextraktion isoliert. Anschließend wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Nach Überprüfung der so ermittelten Sequenz mittels BLAST konnte die amplifizierte Bande eindeutig als Amplifikat eines Teils von CEACAM16 identifiziert werden. Es handelte sich um den genomischen Abschnitt, der für die L- und N-Domäne inklusive dem erwarteten Intron kodiert. Um zu überprüfen, ob dieses Gen auch beim Pferd exklusiv im Innenohr exprimiert wird, wurde eine Expressionsstudie mittels RT-PCR von den vorhandenen equinen Gewebeproben durchgeführt. In einigen Geweben waren schwache

Banden auf der erwarteten Höhe zu finden, darunter auch die Proben vom Innenohr und der Hypophyse (Abb.12B). Nach Sequenzierung der dort entstandenen Amplifikate, konnte jedoch keine Sequenzübereinstimmung mit CEACAM16 festgestellt werden. Vielmehr handelte es sich um eine unspezifische Amplifikation. Eine PCR mit dem 5'-3'Primerpaar konnte nur das Nichtvorhandensein in den entsprechenden Geweben bestätigen (Abb.12C).

4.1.2 CEACAM19

Die Existenz des CEACAM19 Gens erfolgte über die PCR mit der genomischen DNA, die von Granulozyten eines weiblichen Trakehners isoliert wurde (Abb.13A). Nach Bestätigung durch Sequenzierung wurde die mRNA von CEACAM19 in einer Expressionsstudie mit allen equinen Proben in spezifischen Geweben nachgewiesen (Abb.13B). Das Expressionsmuster dieses Gens ist vergleichbar mit dem in der Maus (Zebhauser, 2006), auch im Pferd findet man das CEACAM19 in den Proben von Ösophagus und Zunge. Die Hautprobe blieb beim Pferd jedoch im Vergleich zur Maus negativ. Von den positiven Geweben wurde im Anschluss eine RT-PCR mit dem 5'- 3'Primerpaar durchgeführt, wobei die positiven Gewebe bestätigt werden konnten (Abb. 13C). Ein Hinweis auf differentielles Spleißen konnte nicht erhalten werden.

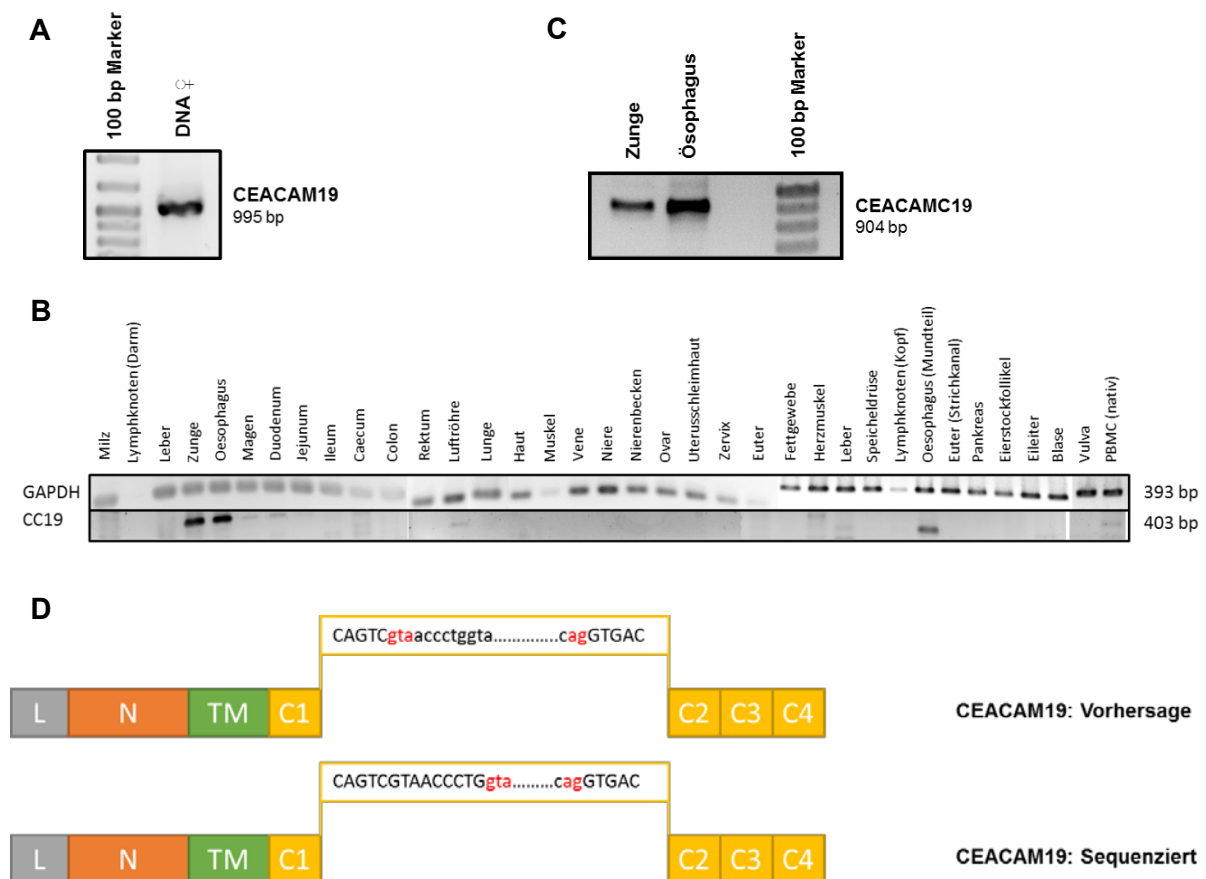


Abb. 15. Detektion und Struktur vom equinen CEACAM19

A: Die Detektion von CEACAM19 erfolgte im Genom des Pferdes mit komplementären Primern in der L- und N-Domäne und der DNA-Probe aus Granulozyten einer Trakehner Stute mit der erwarteten Bande bei 995 bp; **B:** Mittels der zuvor genomisch getesteten Primer für die L- und N-Domäne des CEACAM19 wurde ein Expressionsmuster in den verfügbaren Gewebeproben ermittelt, die erwartete Bande – ohne Intron - liegt bei 403 bp, bei beiden Ösophagus-Proben und der Zunge konnte eine solche Bande gezeigt werden; **C:** Zur Analyse der Sequenz vom equinen CEACAM19 erfolgte eine Detektion mit entsprechenden full-length Primern in den positiv getesteten Gewebeproben zur Extraktion und Klonierung bei der erwarteten Größe von 904 bp; **D:** Eine schematische Darstellung der Struktur von CEACAM19 laut Vorhersage und die nach Sequenzierung ermittelten Unterschiede.

Nach der Sequenzierung von CEACAM19, isoliert aus dem Ösophagus, konnten nach dem Abgleich der vorhergesagten und der sequenzierten Sequenz zwei Feststellungen getroffen werden. Zum einen existiert, anders als von NCBI vorhergesagt, nur eine der drei angenommenen Spleißvarianten des Gens. Die vollständige Sequenz des ermittelten CEACAM19 ist im Anhang (9.3) zu finden. Des Weiteren fand sich ein Unterschied zu der von uns vorhergesagten Sequenz, die in Abb. 13D schematisch dargestellt wurde. Es wurde an der Spleißstelle zwischen der ersten und der zweiten zytoplasmatischen Domäne eine andere als die angenommene Spleiß-Donorstelle genutzt. Diese liegt genau drei Tripletts hinter der vorhergesagten Donorstelle, weshalb die betroffene C1-Domäne um neun Basenpaare länger ist. Diese Modifikation führt drei zusätzliche Aminosäuren ein. Es entsteht durch die drei zusätzlichen Aminosäuren aber weder eine Verschiebung im Leseraster noch ein neues Stopp-Codon, weshalb das CEACAM19 auch das vorhergesagte ITAM-Motiv trägt. Laut NCBI sind für das Pferd drei Varianten des CEACAM19 vorhergesagt. Hier konnte aber gezeigt werden, dass nur eine Variante existieren muss. Alle positiv getesteten Gewebe wiesen dieselbe Spleißvariante auf.

Die beiden anderen konservierten, tierartübergreifend nachgewiesenen CEACAM-Mitglieder, CEACAM18 und CEACAM20 (Zebhauser *et al*, 2005) konnten im Pferd nicht identifiziert werden. Für CEACAM20 lassen sich zwar Vorhersagen einer mRNA-Sequenz im NCBI finden, auf deren Grundlage im Rahmen dieser Arbeit Primer entworfen wurden. Eine PCR mit den so erhaltenen Primern hatte nur negative Ergebnisse zur Folge. Auch eigene Sequenzanalysen, die in der AG Kammerer durchgeführt wurden, ergaben keine Hinweise auf das Vorliegen von CEACAM20 im Pferd (Aleksic *et al*, 2016). Weshalb davon ausgegangen werden muss, dass dieses CEACAM im Pferd nicht mehr vorkommt. Da für CEACAM18 weder eine Vorhersage im NCBI zu finden war, noch in eigenen Analysen des CEACAM-Lokus im Pferd Hinweise darauf gefunden wurden, wurde dieses Gen nicht gesucht und es ist auch hier davon auszugehen, dass es beim Pferd fehlt.

4.2 CEACAM1 und CEACAM1-verwandte Gene

Neben den konservierten Mitgliedern der CEA-Genfamilie finden sich im publizierten Genom des Pferdes noch Hinweise auf weitere Mitglieder der Familie, die allesamt aus der Duplikation des CEACAM1 Gens hervorgegangen zu sein scheinen. Die Exonstruktur dieser Mitglieder wurde mit Hilfe von Ähnlichkeiten der einzelnen Domänen zu anderen untersuchten Spezies und dem Vorhandensein möglicher Spleißstellen (Donor/Akzeptor), sowie der Existenz der Kosak-Sequenz vor der Leader-Domäne (Kosak M., 1987) ermittelt und sind in Abb. 16 für die membranverankerten Mitglieder schematisch dargestellt.

Obwohl auf Genomebene bestimmte Domänen vorhergesagt werden konnten, besteht auf Proteinebene noch die Möglichkeit vom alternativem Spleißen. Dieses Phänomen konnte auch bei anderen Spezies für Mitglieder der CEA-Genfamilie, speziesübergreifend vor allem bei CEACAM1, nachgewiesen werden (Gray-Owen *et al*, 2006; CEA-homepage). Darum wurde in RT-PCR-Studien von verschiedenen Gewebeproben vom Pferd die vorhergesagte Sequenz überprüft und die mit spezifischen Primerpaaren entstandene Banden aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und anschließend nach der modifizierten Methode nach Sanger *et al* (1977) sequenziert. Dabei konnte auch das Vorhandensein von vermuteten Stop-Codons überprüft werden (Abb.14).

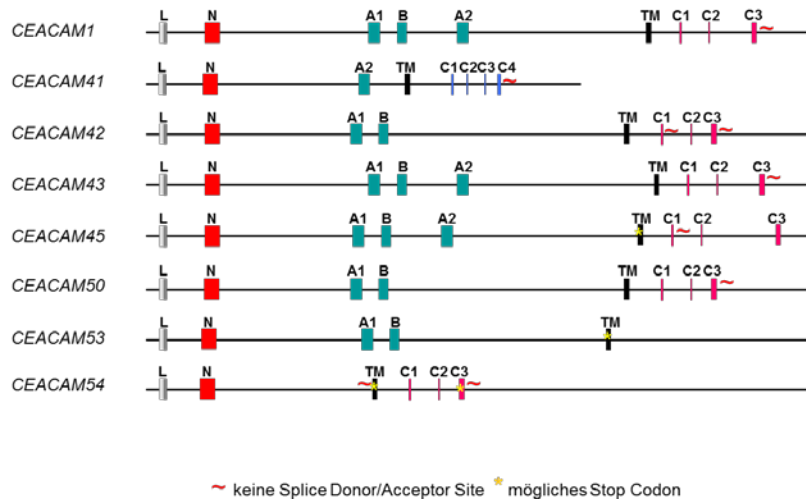


Abb.14: Exonstruktur der membranverankerten equinen CEA-Genfamilien Mitglieder auf Genomebene, (Aleksic *et al.*, 2016)

Durch Datenbankanalysen konnten das equine CEACAM1 und die aus ihm hervorgegangenen membranverankerten CEACAMs im Genom des Pferdes ermittelt werden. Dargestellt sind neben den genomisch nachzuweisenden Exonen für die einzelnen Domänen auch potentielle Stopp-Codons und fehlende funktionelle Spleiß-Donor- oder Spleiß-Akzeptorstellen. Die L-Domäne ist grau dargestellt, die N-Domäne rot, die weiteren extrazellulär zu findenden A- und B-Domänen sind durch blaue Kästchen gekennzeichnet. Die Transmembrandomänen sind schwarz und die zytoplasmatischen Domänen pink unterlegt. Potentielle Stop-Codons sind durch gelbe Sterne in der jeweiligen Domäne markiert und die veränderten Speiß-Donor oder Spleiß-Akzeptorstellen sind durch ein rotes Wellenzeichen gekennzeichnet.

4.2.1 CEACAM1 und CEACAM43

Das CEACAM1, welches den Ursprung der CEA-Genfamilie im Pferd darstellt, wurde in der Arbeitsgruppe von Robert Kammerer schon teilweise untersucht (Mißbach *et al.*, 2018). Im Zuge seiner Bachelorarbeit konnte Denis Aleksic (2010) mögliche Gewebe, in denen das Gen exprimiert wird, mit Hilfe der aufgeführten Primerpaare, die den Bereich von der Leader (L)-Domäne bis zur N-Domäne abdecken, identifizieren. Darauf aufbauend konnten in den entsprechenden Geweben verschiedene Spleißvarianten identifiziert werden. Das CEACAM1 tritt im Pferd mit mindestens 4 verschiedenen Varianten in Erscheinung (Abb.15). Eine solche Diversität von CEACAM1 ist auch aus anderen untersuchten Spezies bekannt, wobei die Spleißvarianten teilweise auch mit einem funktionellen Unterschied des Gens einhergehen (Singer *et al.*, 2002). Ähnlich wie auch in anderen Spezies, wie dem Menschen, der Ratte und der Maus, konnten im Pferd zwei Isoformen des Gens CEACAM1 nachgewiesen werden (Öbrink, 1997; Singer, *et al.*, 2002). Es gibt eine Isoform mit einem längeren zytoplasmatischen Anteil, die deshalb entsprechend der Nomenklatur auch als CEACAM1-L bezeichnet wurde (Beauchemin *et al.*, 1999). Die zweite Isoform entspricht der CEACAM1-S, die auch schon in anderen Spezies gezeigt wurde (Singer, *et al.*, 2002). Die beiden Isoformen zeigen in Bezug auf ihren extrazellulären Anteil auch jeweils noch zwei alternative Spleißvarianten in Bezug auf die Anzahl ihrer Ig-Domänen, was auch schon für die humanen CEACAM1 Isoformen, jedoch nicht für die nagerspezifischen CEACAM1 bekannt ist (Singer, B. *et al.*, 2002). Im Pferd finden sich jeweils Variationen mit 4, beziehungsweise 2 Ig-Domänen, die entsprechend als CEACAM1-4S/CEACAM1-2S und CEACAM1-4L/CEACAM1-2L bezeichnet wurden (Abb.15A). Zu finden ist das CEACAM1, wie auch in den anderen zuvor erwähnten Spezies, auf allen immunologisch relevanten Zelltypen des weißen Blutbildes, besonders auf den B-Lymphozyten und auf Epithelzellen (Mißbach *et al.*, 2018). Neben dem CEACAM1 existiert im Pferd, ähnlich wie in der Maus (Öbrink, 1997), ein fast identisches Gen. In der Maus ist es als CEACAM2 bekannt, für das Pferd haben wir es, der fortlaufenden Nummerierung folgend, als CEACAM43 bezeichnet (Beauchemin *et al.*, 1999). Die Identifikation von CEACAM1 erfolgte auf Grund der Lage im

Genom. Es befindet sich in der Nähe spezifischer Gene, die auch im Genom anderer Tiere in der unmittelbaren Umgebung zu finden sind. Das identische CEACAM43 liegt auf dem Genstrang in Leserichtung gesehen, direkt dahinter. Vom CEACAM43 existiert bisher nur eine nachgewiesene Variante, die mit der Vorhersage übereinstimmt und sowohl auf Granulozyten, als auch spezifisch im Nierenbecken gefunden wurde (Mißbach *et al*, 2018).

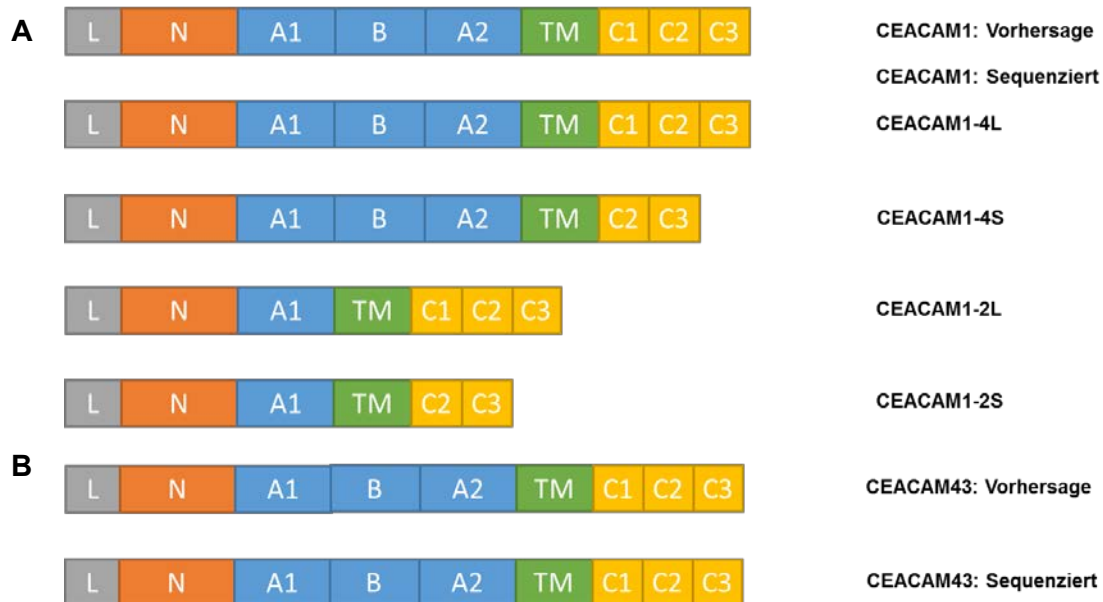


Abb.15 Die Exonstruktur von CEACAM1 und seinen Spleißvarianten und seinem verwandten Gen CEACAM43

A. Gezeigt ist die schematische Darstellung der Exonstruktur aller beim Pferd bisher nachgewiesenen CEACAM1-Isoformen und ihrer Spleißvarianten. Ähnlich wie in anderen untersuchten Spezies, lassen sich auch im Pferd Varianten mit einer langen und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne finden. Auf extrazellulärer Seite gibt es dann auch noch verschiedene Spleißvariationen, die sich als lange Variante mit vier extrazellulären Ig-Domänen und kurze Variante mit nur zwei extrazellulären Ig-Domänen darstellen. Beide Varianten gibt es sowohl mit kurzem, als auch mit langem zytoplasmatischen Anteil. Sie werden entsprechend der Nomenklatur als CEACAM1-4L/-2L oder CEACAM1-4S/-2S bezeichnet. **B.** Aufgezeigt ist die durch Sequenzierung bestätigte Exonstruktur des CEACAM1 verwandten Gens CEACAM43 in Form eines Schemas. Durch die Sequenzierung der einzigen Spleißvariante konnte die vorhergesagte Struktur bestätigt werden.

4.3 CEACAM1-verwandte Mitglieder mit Exonen, die für eine Transmembrandomäne kodieren

Im Genom des Pferdes finden sich, wie in Abb.14 gezeigt, neben CEACAM43 Hinweise auf noch sechs weitere Paraloge von CEACAM1 die über eine Transmembrandomäne verfügen. Es konnten bereits spezifische Gewebe identifiziert werden, in denen einzelne dieser Gene exprimiert werden (Aleksic, D. 2010). Für diese Expressionsstudien wurden Primerpaare entworfen, die Amplifikate, beginnend in der N-Domäne bis zur A-Domäne bilden (Primertab.1). Bei den Expressionsanalysen wurden unterschiedlich starke Banden für ein und dasselbe CEACAM in den verschiedenen Gewebeproben beobachtet, was auf eine stärkere Expression in dem entsprechenden Gewebe hinweisen könnte. Die stärkere Expression könnte dann eventuell auch auf das Vorliegen verschiedener Spleißvarianten der verschiedenen equinen CEACAM-Mitglieder hindeuten. Diese Theorie muss aber erst durch entsprechende Analysen des vollständigen Gens in den einzelnen Geweben bestätigt werden. Im Zuge der Bachelorarbeit von Aleksic, D., 2010 wurde jedoch noch keine Analyse der vollständigen Gene mit Hilfe spezifischer full length 5'-3'-Primerpaare unternommen und somit auch noch keine Existenz von potenziellen Spleißvarianten dieser Gene überprüft. Im Rahmen dieser Arbeit werden die vorhandenen Daten von Aleksic, D. nun um die Analyse

der vollständigen Gene und ihrer Struktur ergänzt. Das Augenmerk liegt dabei auch auf potenziell vorhandenen Spleißvarianten der einzelnen Mitglieder vor allem in Bezug auf ihre möglichen, unterschiedlichen Funktionen. Da fast alle Abkömmlinge des CEACAM1 ein Exon besitzen, dass ein mögliches Tyrosin-basiertes Signalmotiv in Form eines ITIM oder ITAM trägt, könnten dadurch schon mögliche Rückschlüsse auf einzelne Funktionen der Mitglieder der CEA-Genfamilie im Pferd gezogen werden.

Gewebe	CEACAM1	CEACAM41	CEACAM42	CEACAM43	CEACAM45	CEACAM50	CEACAM53
Milz					+		
PBMCs				+	+		
PBMCs, 7d	++		+	+++	++		
PBMCs, 14d		++		++	++		
PBMCs, 19d		++		++	+++	+	
Nieren	+		+	++	+		
Nierenbecken	++				+		
Endometrial Cup	++			+	++	+	
Lunge				+	++		
Leber	+++			++	+	+	
Vulva	+		+		+++		+
Duodenum	++		++	+++	+++	++	
Jejunum			+	++	++		
Ileum			+	++	++		
Caecum	+		++	+	+++	++	
Colon			++	+	++	+	
Rektum	+		++	+	++		

Tabelle 20: Expressionsmuster und Intensität der bereits untersuchten membranverankerten Mitglieder der CEA-Genfamilie (Aleksic 2010)

Aus den verschiedenen equinen Gewebeproben wurde die cDNA auf das Vorhandensein der einzelnen CEACAM- Mitglieder mittels PCR-Analyse untersucht. Dazu wurden Primer komplementär zu der N- und der A-Domäne der verschiedenen, vorhergesagten, membranverankerten CEACAM-Mitglieder entworfen. Die untersuchten Gewebe wiesen teilweise unterschiedlich starke Banden auf. Die Intensität der entsprechenden Bande auf dem Agarosegel wird durch die Anzahl der (+) verdeutlicht.

Im weiteren Verlauf werden hier die untersuchten, membranverankerten CEACAM-Mitglieder einzeln dargestellt. Sie sind im Folgenden geordnet nach dem Vorhandensein einer Transmembrandomäne, ohne zytoplasmatischen Anteil und dem Besitz einer zytoplasmatischen Domäne, inklusive dem Auftreten und der Art des vorhergesagten Signalmotivs in Form des ITIM oder ITAM.

4.3.1 CEACAM1-verwandte Mitglieder mit einer Transmembrandomäne ohne zytoplasmatische Domäne

4.3.1.1 CEACAM53

Unter den transmembranverankerten Mitgliedern findet sich nur ein Vertreter, von dessen Exonstruktur im Genom kein Hinweis auf einen zytoplasmatischen Anteil besteht (Abb.14). Durch die Studien von Denis Aleksic (2010) konnte für dieses CEACAM nur ein positives Gewebe detektiert werden, die Vulva-Schleimhaut. Zusätzlich ist die Expressionsintensität in diesem Gewebe nicht sehr stark. Die PCR mit dem N-A-Primerpaar wurde wiederholt und die entstandene Bande sequenziert und als CEACAM53 bestätigt, bevor die PCR mit dem 5'-3'-Primerpaar durchgeführt wurde. Die aus der full-length PCR erhaltene Bande wurde aus dem Gel extrahiert und wie beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde die erhaltene cDNA mit Hilfe des StrataClone Cloning Kits kloniert und sequenziert (Abb.16).

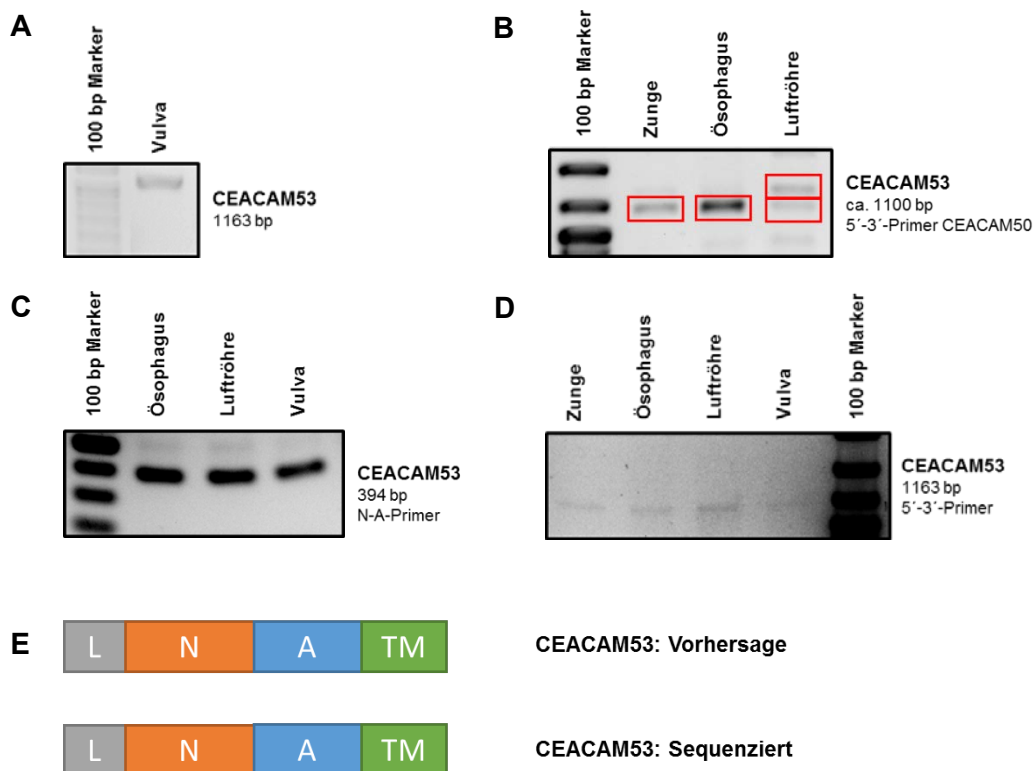


Abb.16: Expression und Struktur des membrangebundenen CEACAM53. **A:** Full length PCR in der durch die N-A-Primer bestätigten Gewebeprobe der Vulva, mit einer Bande auf Höhe der erwarteten 1163bp. **B:** Full length PCR für das CEACAM50 bei der durch Fehlpriming in Zunge, Ösophagus und Luftröhre durch Sequenzierung bestätigte Banden für CEACAM53 amplifiziert wurden. **C:** Überprüfung eines Teils der durch die CEACAM50 PCR neu entdeckten CEACAM53-positiven Gewebe mit den N-A-Primern und der Vulvaprobe als Positivkontrolle, mit positivem Ergebnis für alle. **D:** Bestätigung der Ergebnisse aus B. und C. in einer full length PCR für CEACAM53 mit der Vulvaprobe als Positivkontrolle **E:** durch Genomanalysen vorhergesagte Struktur von CEACAM53 und durch Sequenzierung bestätigte Struktur von CEACAM53.

In der erhaltenen Sequenz fanden sich im Unterschied zu der Vorhersage insgesamt vier Basenaustausche, zwei in der N-Domäne und zwei in der A-Domäne. Auf Aminosäureebene haben diese Wechsel aber nur einen Austausch zur Folge. Diese Einzelbasenaustausche ohne größere Folgen könnten sogenannte SNPs (single nucleotid Polymorphismen) sein. Da die hier analysierten Proben von einem anderen Tier stammen, als dem, das für die whole genom Sequenzierung genutzt wurde, wären solche SNPs als individuelle Unterschiede erklärbar. Die Anzahl und Anordnung der Domänen stimmt mit der Vorhersage überein und das Stopp-Codon in der Transmembrandomäne konnte bestätigt werden (Abb.17).



Abb.17: Nachgewiesene Aminosäureaustausche (SNPs) nach Sequenzierung im Vergleich zur Vorhersage. Im Vergleich zur oberen vorhergesagten Sequenz von CEACAM53 befinden sich in der sequenzierten Probe aus der Vulvaschleimhaut insgesamt 4 Basenaustausche, die hier rot gekennzeichnet sind. Jeweils 2 befinden sich in der N-Domäne und 2 in der A-Domäne. Da die Gewebeprobe von einem anderen Tier stammen, als die der whole genom shotgun Sequenz, kann es sich hierbei um sogenannte SNPs handeln, die individuell auftreten können.

Durch Fehlbindung der full length Primer für das CEACAM50 konnte CEACAM53 noch in zwei weiteren Geweben identifiziert werden (Abb.16). Auch hier handelt es sich um die Spleißvariante, die schon aus der Probe der Vulvaschleimhaut extrahiert werden konnte. Und auch hier konnten Basenaustausche im Vergleich zu der vorhergesagten Sequenz gefunden werden. In der Probe aus der Speiseröhre gab es insgesamt 6 Austausche, vier im Bereich der N-Domäne und zwei in der A-Domäne (Abb.18). Die Sequenz aus der Luftröhre war für genauere Analysen nicht genau genug. Eine Klonierung der Proben mit anschließender Sequenzierung würde sich dafür empfehlen. Da aber keine neuen Spleißvarianten vorliegen, wurde hier darauf verzichtet. Die durch Fehlpriming positiv getesteten Gewebe konnten in einer neuen PCR mit den entsprechenden Primerpaaren für das CEACAM53 auch als positiv bestätigt werden (Abb.16).

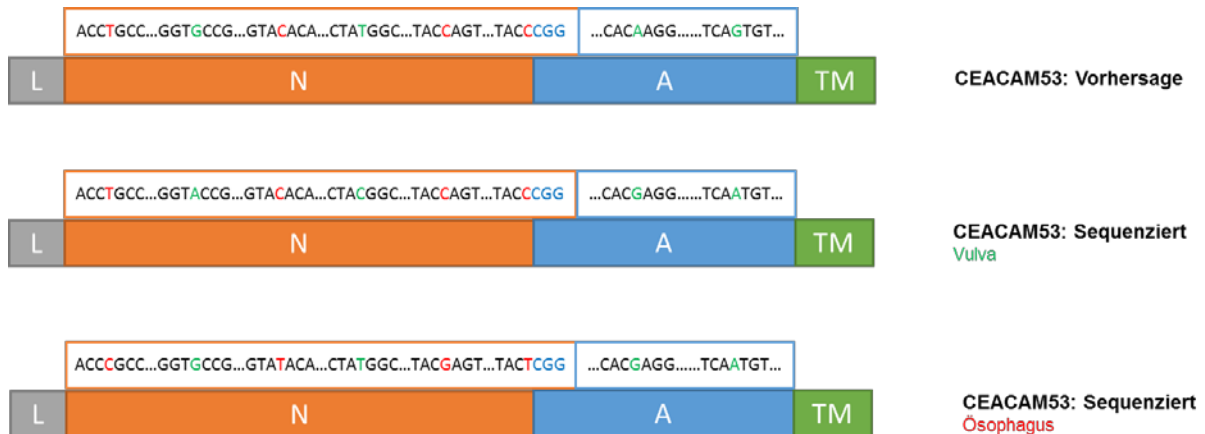


Abb.18: Vergleich der vorhergesagten Sequenz mit den beiden Sequenzen aus Vulva und Ösophagus: Dargestellt sind die insgesamt 6 nachgewiesenen Basenaustausche in Vulva und Ösophagus des analysierten equinen Gewebes im Vergleich zur vorhergesagten Sequenz von CEACAM53. Dabei sind die Basenaustausche grün hinterlegt, die zwischen der Sequenz aus der Vulva und der vorhergesagten Sequenz zu finden waren. Die Basenaustausche, die im Ösophagus nachgewiesen wurden im Vergleich zur vorhergesagten Sequenz sind rot hinterlegt. Alle voneinander zu differenzierenden Basenaustausche befinden sich in der N-Domäne.

4.3.2 Mitglieder mit einer Transmembrandomäne und zytoplasmatischen Exonen die für ein ITIM kodieren

Insgesamt finden sich in den genomischen Vorhersagen sechs Mitglieder der CEA Genfamilie, die auf ihrem zytoplasmatischen Anteil Sequenzbereiche tragen, die für ein inhibierendes Tyrosin basiertes Signalmotiv kodieren. Das Ursprungsgen CEACAM1 und sein Duplikat das CEACAM43, die schon zu Beginn dieses Abschnitts beschrieben wurden und zumindest in einem Teil der Spleißvarianten ein ITIM-Motiv zeigen, gehören auch zu diesen Mitgliedern, werden hier aber nicht noch einmal genauer beschrieben. Im weiteren Verlauf werden die weiteren vier Mitglieder der CEA-Genfamilie dieser Kategorie separiert beschrieben.

4.3.2.1 CEACAM42

Das CEACAM42 ist anders als das CEACAM43 kein exaktes Duplikat von CEACAM1, es unterscheidet sich in der vorhergesagten Exonstruktur durch das generelle Fehlen der extrazellulären A2-Domäne von CEACAM1 (Abb.14). Weiterhin finden sich auf Exon-Ebene schon Hinweise auf ein Vorhandensein verschiedener Exonstrukturen dieses Gens. Wie in Abb.14 zu sehen ist, findet man am Ende des C1-Exons keine eindeutige Spleiß-Donorstelle, was zur Folge haben kann, dass an dieser Stelle kein Spleißen stattfindet. Normalerweise kennzeichnet solches Fehlen der Spleiß-Donorseite das Ende des Gens, aber bei CEACAM42 finden sich neben der C1-Domäne auch noch eine C2- und eine C3-Domäne im Anschluss an diese Sequenz anstatt einem Poly-A Signal. Interessant ist nun, welche Auswirkungen genau dadurch für das Spleißen entstanden sind.

Die cDNA von CEACAM42 wurde mit Hilfe der mRNA des Caecums generiert. Wie Denis Aleksic schon nachgewiesen hat konnten wir eine starke Expression von CEACAM42 im Caecum bestätigen (Abb.19). Um nun zu untersuchen wie die genaue Struktur des CEACAM42 ist und ob das CEACAM42 in verschiedenen Isoformen vorliegt, wurde eine RT-PCR mit dem 5'-3'Primerpaar durchgeführt. Die entstandene, singuläre Bande war etwa 300 bp kürzer, als die erwartete Länge von 1390 bp, was etwa der Größe einer der extrazellulären Domänen entspricht. Um zu überprüfen, wie diese Verkürzung zustande kommt, wurde die entsprechende Bande aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und mit dem StrataClone Cloning Kit in den pSC-A Vektor kloniert. Nachfolgend wurde das Isolat aus verschiedenen Klonen sequenziert. Das Resultat war immer die gleiche Spleißvariante des Gens. In allen analysierten Klonen fehlen identisch zwei Domänen, die extrazelluläre B-Domäne und die zytoplasmatische C1-Domäne. Diese Größe beider Domänen zusammengenommen, ergibt eine Basenlänge von 302 bp, womit die Größe der tieferen Bande auf dem Agarosegel exakt erklärt wäre. Darüber hinaus sind im Gegensatz zur angenommenen Sequenz zwei Basenpaare ausgetauscht, was in zwei Aminosäure-Austauschen resultiert (Abb.19). Außerdem konnte ein Stopp-Codon am Ende der Transmembrandomäne detektiert werden, welches auch schon in der vorhergesagten Sequenz existiert, aber zuvor noch nicht bemerkt wurde. Somit existiert zwar auf mRNA-Ebene der zytoplasmatische Teil, der für das ITIM-Motiv verschlüsselt. Allerdings ist diese Sequenz für das entstehende Protein am Ende irrelevant, da das Stopp-Codon schon weit davor liegt. Das Protein besteht somit ähnlich dem zuvor beschriebenen CEACAM53 nur aus einem extrazellulären Teil, der über die Transmembran-Domäne in der Zellmembran verankert ist. Im Anschluss wurde noch bei einem Teil der von Denis Aleksic im Zuge der Bachelorarbeit 2010 positiv getesteten Gewebe eine full-length PCR angeschlossen, wobei fast der komplette Darm als CEACAM42 positiv bestätigt werden konnte (Abb.19). Auch bei diesem Gen konnten durch Fehlpriming eines 5'-3'Primerpaares (CEACAM45, Klonierung) noch weitere positive Gewebe detektiert werden, genauer die Niere und das Nierenbecken. Diese Gewebe waren mit den N-A-Primern bereits als für das CEACAM42 positive Gewebe beschrieben worden. Allerdings konnte mit den 5'-3'Primern für das CEACAM42 keine entsprechende Bande amplifiziert werden. Die aus diesen Geweben isolierte Bande zeigte

die bereits beschriebene Spleißvariante auf, auch die beiden bereits bekannten Basenpaare waren hier wieder ausgetauscht.

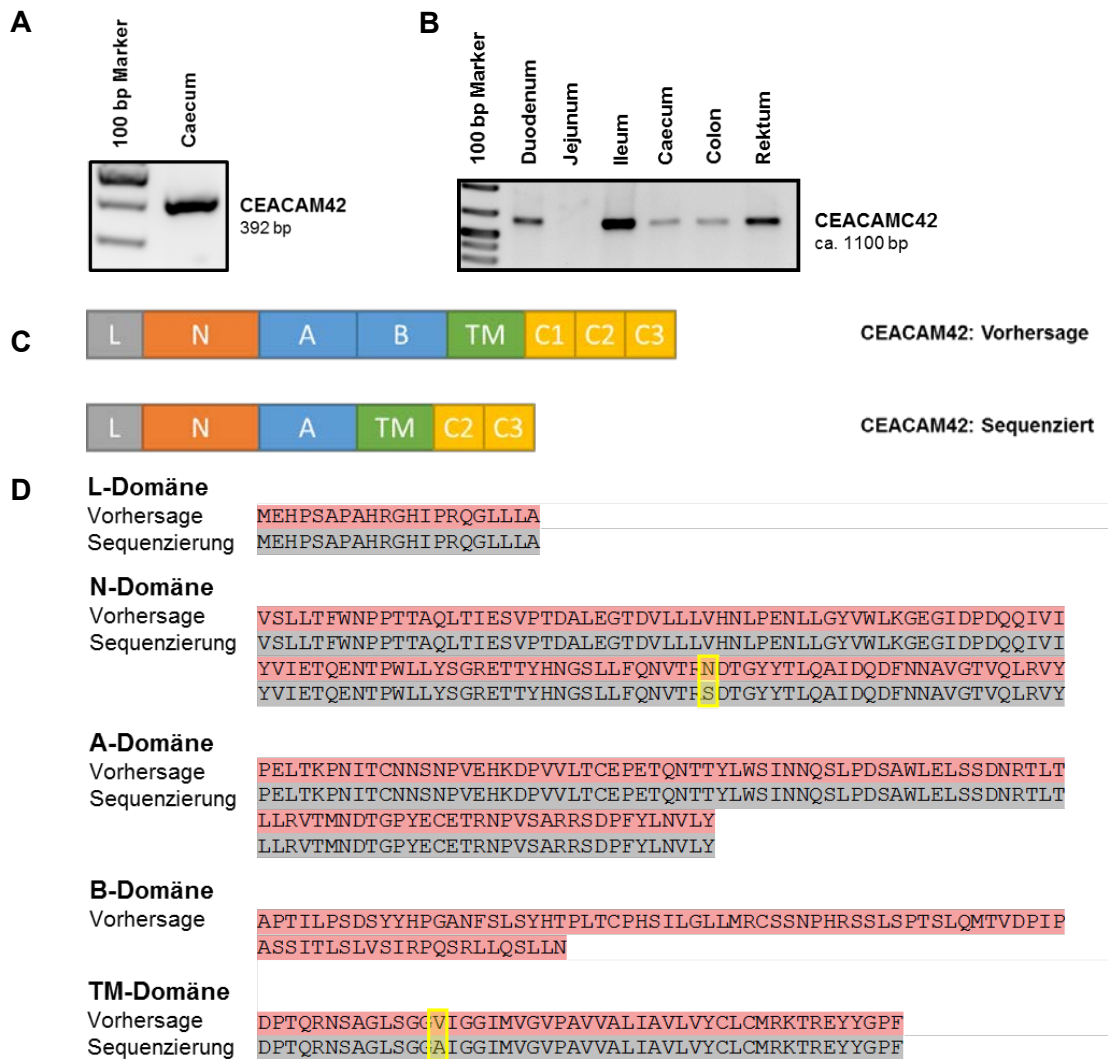


Abb.19: Expression und Struktur des membranverankerten CEACAM42

A. Bestätigung der Existenz von CEACAM42 im Caecum mit dem Primerpaar, das die Amplifikation von der N-Domäne bis zur A-Domäne ermöglicht. Die amplifizierte Bande entspricht der erwarteten Größe von 392 bp; **B.** PCR mit full length Primern zur Überprüfung der Existenz von CEACAM42 in den zuvor mit dem N-A-Primerpaar positiven Gewebeproben, alle amplifizierten Banden sind dabei etwa 300 bp kürzer als vorhergesagt, was für eine Spleißvariante spricht in der eine oder mehrere Domänen fehlen. Durch Sequenzierung wurde das Fehlen der Ig-B-Domäne und der C1-Domäne, die zusammen 302bp umfassen, bestätigt; **C.** schematische Darstellung der anhand von Genomanalysen vorhergesagten Exonstruktur und ihr gegenüber die durch Sequenzierung bestätigten einzigen nachweisbare Spleißvariante von CEACAM42, die exprimiert wird; **D.** Vergleich der Aminosäuresequenz von CEACAM42 auf Grundlage der vorhergesagten mRNA-Sequenz zu der sequenzierten mRNA-Sequenz aus dem Caecum. Rot hinterlegt ist die vorhergesagte Sequenz und blau hinterlegt die durch Sequenzierung bestätigte. Gelb markiert sind die aus den Basenaustauschen resultierenden Aminosäureaustausche.

Somit konnte für das CEACAM42 nur eine Spleißvariante nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass nicht doch eine weitere Spleißvariante existiert, in der die C1-Domäne vorhanden ist, wurde ein zweites Primerpaar entworfen. Bei diesem liegt der Reverseprimer bei einer weiteren, im Genom gefundenen, potentiellen Poly-A-Sequenz. Diese liegt im Intron, das dem Exon der Transmembran-Domäne folgt. Diese PCR ergab kein positives Resultat (ohne Abbildung). Das legt die Vermutung nahe, dass das Intron zwischen der

Transmembran-Domäne und der C1-Domäne mit dem möglichen Poly-A Signal immer herausgespleißt wird.

4.3.2.2 CEACAM45

Das CEACAM45 ist neben dem CEACAM1 das einzige Mitglied der Genfamilie, was ubiquitär exprimiert zu sein scheint, wenn man die Expressionsstudien von Denis Aleksic betrachtet (2010). Laut Exonstruktur (Abb.14) ist es dem CEACAM1 auch vom Aufbau sehr ähnlich, da es aus vier extrazellulären und drei intrazellulären Domänen besteht. Ähnlich wie bei dem zuvor beschriebenen CEACAM42, gibt es auch beim CEACAM45 nach der C1-Domäne keine eindeutige Spleiß-Donorseite. Des Weiteren findet sich in der vorhergesagten Sequenz ein Stopp-Codon am Ende der Transmembran-Domäne.

Um dies zu bestätigen, wurde ein Gewebe herausgesucht, in dem eine besonders starke CEACAM45-Expression erwartet werden konnte. Wie auch bei dem vorher beschriebenen CEACAM42 handelte es sich dabei um die Probe des Caecums. Auch hier wurde zunächst über die von Denis Aleksic bereits eingesetzten N-A-Primer und eine Sequenzierung bestätigt, dass es sich nachweislich um das CEACAM45 handelt (Abb.20), um dann anschließend mit den 5'-3'-Primern ein full length Amplifikat zu erhalten. Es entstand eine Bande auf Höhe von 1500 bp, die der erwarteten Länge für das Amplifikat von CEACAM45 von 1539 bp entsprach. Zur weiteren Analyse wurde diese Bande aus dem Gel extrahiert. Um dieses Amplifikat komplett sequenzieren zu können, wurde wieder das StrataClone Clonig Kit genutzt und das CEACAM45 in dem pCS-A Vektor sequenziert. Auf Grund von Kompatibilitätsproblemen mit dem Cloning Kit und dem Amplifikat, erfolgte eine Modifikation der Primer unter Beachtung der Vorgaben für das StrataClone Cloning Kit. Auf dieser Grundlage gelang die Klonierung von CEACAM45, es wurde in den pSC-A Vektor eingebaut und sequenziert. Bei dem klonierten Gen handelt es sich um eine Spleißvariante, bei der die C1-Domäne fehlt (Abb. 20). Diese Domäne besitzt, wie schon erwähnt, laut Vorhersage keine eindeutige Spleiß-Donorseite und wurde wahrscheinlich deswegen ausgelassen. Das in der Transmembrandomäne vermutete Stopp-Codon konnte nach der Sequenzierung bestätigt werden und sorgt auch bei diesem Mitglied der Genfamilie auf Proteinebene für den Verlust des intrazellulären Anteils. Auf mRNA-Ebene ist die Sequenz, die für das Signalmotiv in Form des ITIM steht aber unversehrt enthalten. Beim weiteren Screening der für CEACAM45 positiven Gewebe, konnte in einigen davon eine zweite Bande detektiert werden (Abb.20), die etwas mehr als 200 bp unter der bereits sequenzierten lag. Diese Größe würde zum Beispiel einer der A-Domänen entsprechen. Das Vorliegen einer möglichen zweiten Spleißvariante des Gens wurde entsprechend überprüft. Die fragliche Bande wurde extrahiert, aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte ohne vorhergehende Klonierung. Im Resultat konnte eine weitere Spleißvariante des CEACAM45 bestätigt werden. In der, wie vermutet eine A-Domäne fehlt. Betroffen ist die A2-Domäne. Im Anschluss wurde auch dieses Amplifikat mit dem StrataClone Cloning Kit kloniert und vollständig sequenziert. Auch in diesen Klonen befand sich das Stopp-Codon in der Transmembrandomäne und die zytoplasmatischen Domänen waren nur auf mRNA-Ebene vorhanden. Wie auch in der zuerst beschriebenen Variante dieses Gens fehlte allerdings wieder die C1-Domäne (Abb.20).

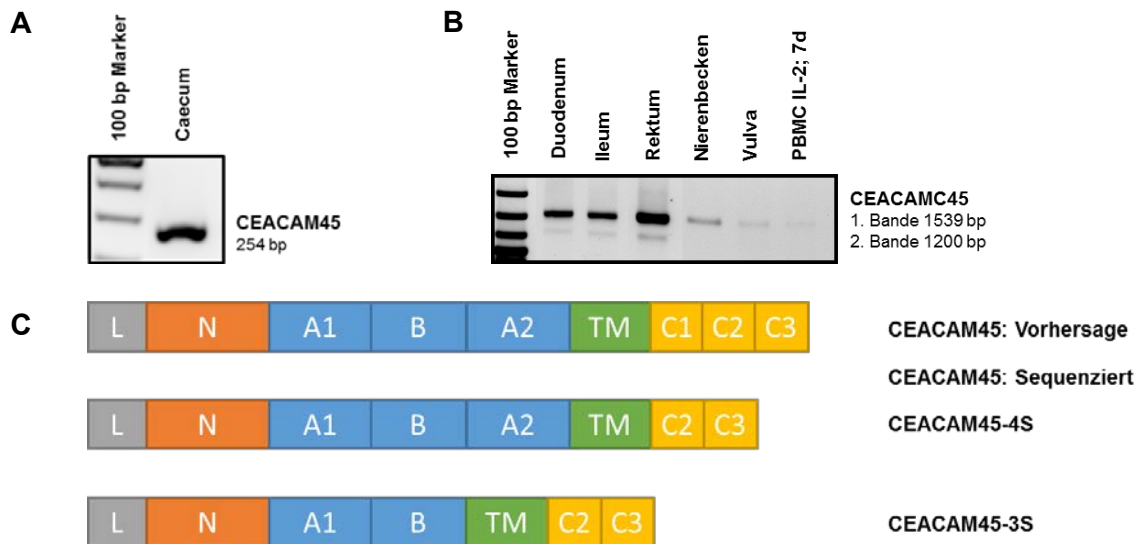


Abb.20: Expression, Struktur und nachgewiesene Spleißvarianten des membranverankerten CEACAM45

A. Detektion von CEACAM45 mittels PCR mit dem N-A-Primerpaar auf einer Gewebeprobe aus dem Caecum. Die Bande wurde durch Sequenzierung als CEACAM45-Fragment bestätigt; **B.** Ausgewählte Gewebeproben, die mit Hilfe des full length Primerpaares als positiv für das CEACAM45 bestätigt werden konnten. In den gezeigten Proben aus den einzelnen Darmabschnitten ist deutlich eine Doppelbande zu erkennen, die in den anderen gezeigten Geweben nicht nachgewiesen werden konnte. Beide Banden stellen eine Spleißvariante des CEACAM45 dar, wobei die 1200bp-lange Variante nur im Darm exprimiert wird. **C.** Die schematische Darstellung der vorhergesagten Exonstruktur von CEACAM45 und der nach Sequenzierung bestätigten beiden Spleißvarianten im Pferd. Die vorhergesagte Sequenz konnte in keiner Gewebeprobe so nachgewiesen werden.

Sie wurden entsprechend der festgelegten Nomenklatur für die CEACAM-Familie bei Mensch, Maus und Ratte benannt (Beauchemin *et al*, 1999).

4.3.2.3 CEACAM50

Das CEACAM50 ist in seiner Exon-Struktur dem CECAM42 sehr ähnlich, es besitzt neben der N-Domäne noch zwei extrazelluläre Domänen und drei intrazelluläre. Allerdings finden sich hier keine Hinweise auf eine mögliche Spleißvariante auf Grund einer nicht vorhandenen Spleiß-Akzeptorstelle oder Spleiß-Donorstelle. Man findet jedoch ein potentielles Stopp-Codon am Ende der Transmembran-Domäne.

Wie auch bei den anderen membranverankerten Mitgliedern der CEA-Genfamilie konnten für das CEACAM50 schon verschiedene Gewebe des Pferdes als positiv identifiziert werden (Aleksic, D., 2010). Und wie auch bei den anderen Mitgliedern der CEA-Genfamilie war der Darm das hauptsächlich exprimierende Gewebe. Allerdings gestaltete sich die Suche nach dem kompletten Gen als schwieriger. Mit dem spezifischen 5'-3'Primerpaar erhielt man zwar in der Caecumprobe eine Doppelbande im Agarosegel. Nach Aufreinigung und Sequenzierung dieser Banden konnte die obere jedoch als CEACAM42 und die untere als CECAM54 identifiziert werden. Auch bei dem Durchscannen der anderen vermeintlich positiven Gewebe konnte keine der erhaltenen Banden als CEACAM50 identifiziert werden. Erst nach dem Entwurf neuer Primer für die full length Analyse konnte aus dem Duodenum eine eindeutige Bande isoliert werden. Diese war allerdings mit knapp 900 bp deutlich kürzer als die erwarteten 1459 bp (Abb.21). Diese wurde mit Hilfe des StrataClone Cloning Kits in den pSC-A Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass das CEACAM50 anders als erwartet in Erscheinung tritt. Zum einen ist die Transmembrandomäne 14 Basenpaare länger als vorhergesagt, da hier ähnlich wie beim CEACAM19 beschrieben, eine andere, als die angenommene Spleiß-Donorstelle nach der

Transmembran-Domäne genutzt wurde. Zusätzlich wurden zwei der drei zytoplasmatischen Domänen beim Spleißen übersprungen, die C1 und die C2- Domäne finden sich nicht in der Sequenz wieder (Abb.21). Die C3-Domäne, die das ITIM-Motiv trägt, ist auf mRNA-Ebene aber noch erhalten. Allerdings kommt es durch die zusätzlichen Basenpaare der Transmembrandomäne im weiteren Verlauf zu einer Verschiebung des Leserasters und einem neuen Stopp-Codon direkt zu Beginn der C3-Domäne, wodurch auch in diesem CEACAM kein ITIM-Motiv auf Proteinebene mehr vorhanden ist (Abb.21).

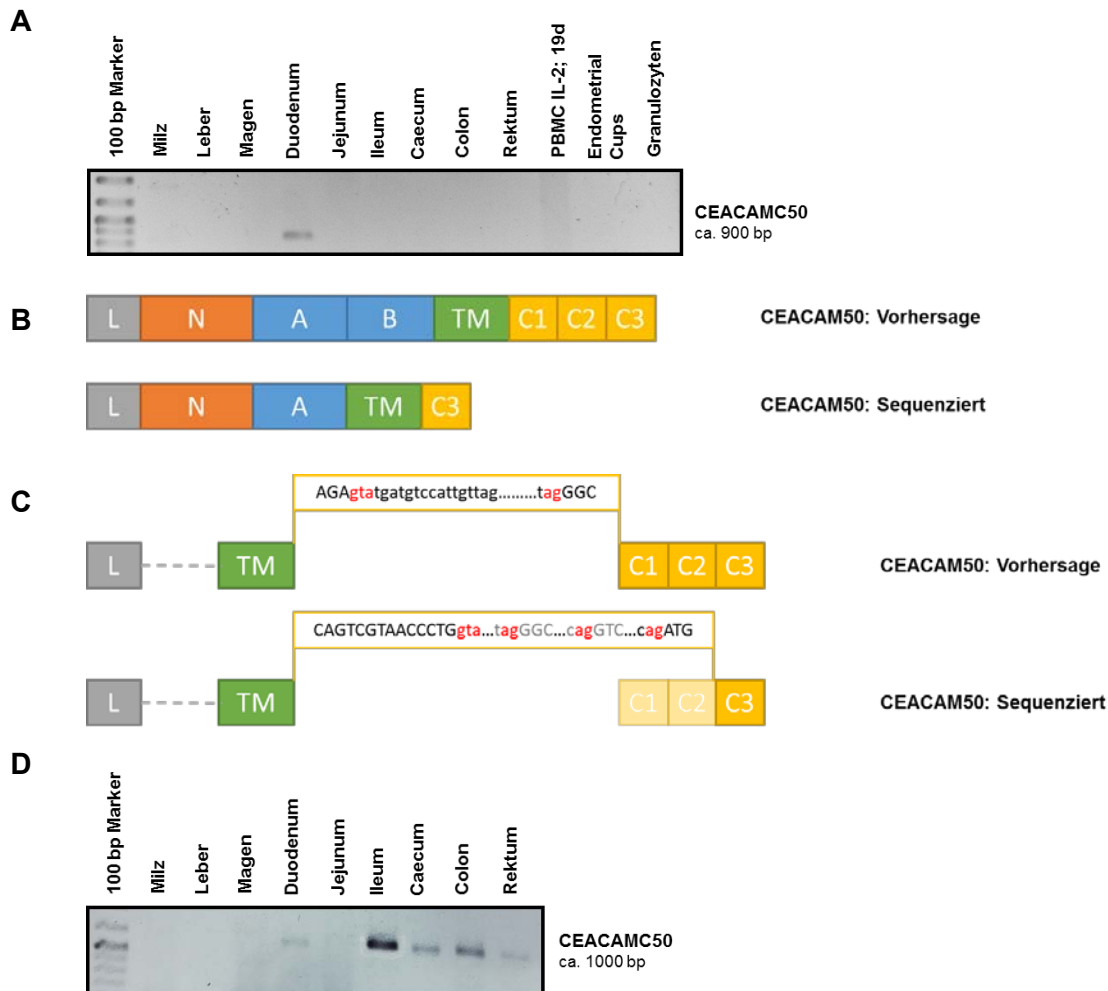


Abb.21: Expression und Struktur des membranverankerten CEACAM50

A. Die PCR mit dem full length Primerpaar für CEACAM50 in den bereits mit den N-A-Primern für dieses Gen positiv getesteten Geweben. Einzig bei der Gewebeprobe aus dem Duodenum konnte eine Bande amplifiziert werden, die jedoch deutlich unter den erwarteten 1459bp liegt; **B.** Zuoberst die vorhergesagte Exonstruktur für das CEACAM50 auf Grundlage der genomischen Sequenz in der whole genom Sequenz des Pferdes und darunter die durch Sequenzierung bestätigte, einzig nachweisbare Spleißvariante von CEACAM50, in der sowohl die B-Domäne, als auch zwei der zytoplasmatischen Domänen fehlen, was die deutlich kürzere PCR Bande unter A. erklärt; **C.** Eine schematische Darstellung der Spleiß-Vorgänge, die vermutlich zu der Variation im zytoplasmatischen Anteil von CEACAM50 geführt haben; **D.** Eine PCR mit einem Reverse-Primer, der am Ende der Transmembrandomäne bindet, um weitere, mögliche, positive Gewebe für CEACAM50 zu detektieren. Mit dem Wissen aus der vorherigen Sequenzierung (C.) konnten so weitere Darmabschnitte für CEACAM50 bestätigt werden, die auch unter dem N-A-Primerpaar positiv waren.

Bei einer Wiederholung des Versuchs von Denis Aleksic aus seiner Bachelorarbeit von 2010 einer PCR für einen Teil der vorhandenen Gewebe mit de N-A-Primerpaar für CEACAM50, konnten alle Darmabschnitte als positiv detektiert werden, jedoch ergab das Screening mit

dem neuen 5'-3'-Primerpaar nur die bereits beschriebene Bande im Duodenum. Deshalb wurde auch bei CEACAM50 nach einem alternativen Poly-A-Signal gesucht. Wie auch bei CEACAM42 fand sich ein solches im Intron nach der Transmembrandomäne. Dementsprechend wurde ein neuer Reverse-Primer entworfen, der am Ende der Transmembrandomäne bindet. Bei der PCR mit diesem Reverseprimer und dem 5'-foreward Primer konnten deutlich mehr positive Gewebe für das Gen detektiert werden (Abb.21). Da alle Amplifikate auf gleicher Höhe lagen, wurde die stärkste Bande extrahiert und sequenziert. Diese zeigte Übereinstimmung mit der vorher isolierten Bande. Da nicht alle Gewebe ein positives Signal gaben, ist fraglich, ob es nicht noch weitere Spleißvarianten dieses Gens gibt, die mit den bisher verwendeten Primerpaaren nicht erfasst werden konnten.

Da das CEACAM50 eine Modifikation aufzeigte, die so bei anderen Vertretern dieser Familie nicht zu finden war, war die Frage, ob es überhaupt auf Zellen exprimiert wird. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde das Gen in einen Expressionsvektor kloniert. Da für das CEACAM50 keine spezifischen Antikörper existieren, musste diesem Vektor zusätzlich ein detektierbares Protein an das CEACAM anlagern. Dazu wurde der pFLAG-CMV3 Vektor genutzt, der N-Terminal das FLAG-Peptid an das CEACAM50 hängt. Dadurch wird der membranverankerte Anteil des Proteins nicht modifiziert und da das FLAG-Peptid extrazellulär an das CEACAM gekoppelt ist, besteht die Möglichkeit es mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu detektieren. Nach transients Transfektion des Plasmids in COS-7 Zellen konnte 24 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe des Anti-FLAG-Antikörpers eine Expression des Fusionsproteins FLAG-CEACAM50 auf den Zellen detektiert werden (Abb.22).

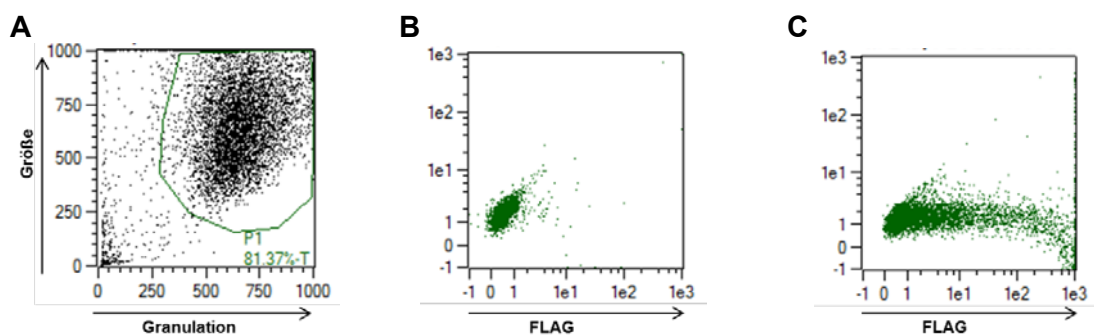


Abb.22: FACS-Analyse der Expression des Fusionsproteins FLAG-CEACAM50 in COS-7 Zellen
A. Abgebildet ist das Gating für die COS-7 Zellen beruhend auf ihrer bekannten Größe und Granulation, um nur lebende, potentiell für das Konstrukt FLAG-CEACAM50 positive Zellen auf Fluoreszenz zu analysieren; **B.** Eine FACS-Analyse von nicht transfizierten Wildtyp COS-7 Zellen, die mit den Anti-FLAG/PE-Antikörpern markiert wurden und als Negativkontrolle für potenzielle Autofluoreszenz des COS-7 Zellen dienen, **C.** Die FACS-Analyse der CEACAM50/FLAG-transfizierten COS-7 Zellen, die ebenfalls mit den Anti-FLAG/PE-Antikörpern markiert wurden. Bereits 24 h nach Transfektion ist eine deutliche Expression des Fusionsproteins im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen in B. zu sehen, wobei eine deutliche Streuung der Expressionsintensität zu vermerken ist.

Die Ergebnisse beweisen, dass das CEACAM50 trotz der starken Abweichungen von der vorhergesagten Struktur als Protein auf der Zelloberfläche von Säugetierzellen, hier stellvertretend COS-7 Zellen eingesetzt, exprimiert werden kann.

4.3.2.4 CEACAM54

Das CEACAM54 wurde bisher noch nicht näher untersucht. Es existiert einzig die vorhergesagte Exonstruktur (Kammer, R., unveröffentlicht; Abb.14). Nach dieser Vorhersage ist es fraglich, ob das Gen überhaupt in membranverankerter Form zu finden ist, denn vor der Transmembran-Domäne findet sich keine eindeutige Spleiß- Akzeptorstelle. Wenn diese Domäne trotzdem zu finden ist, besitzt das CEACAM54 auch drei zytoplasmatische Exone.

Allerdings gibt es auch bei diesem Gen ein mögliches Stopp-Codon in der Transmembran-Domäne. Durch Zufall wurde ein Hinweis auf sein Vorhandensein im Darm (Caecum) durch das Fehlpriming der ersten 5'-3'-Primer für das CEACAM50 entdeckt (wie schon im vorangegangenen Abschnitt beschrieben). Daraufhin wurden spezifische L-N-Primer, sowie 5'-3'-Primer für dieses Gen entworfen und mit Hilfe des Primer designing Tools Primer-BLAST von NCBI auf Kompatibilität überprüft. Zuerst erfolgte die Überprüfung des N-A-Primerpaares mittels einer PCR die auf genomischer DNA von einem Isolat aus einer Trakehner Stute durchgeführt wurde. Die amplifizierte Bande entsprach der erwarteten Größe und konnte nach Sequenzierung als der genomische Abschnitt identifiziert werden, der von den L-N-Primern eingefasst werden sollte (Abb. 23). Mit diesem Primerpaar konnte anschließend ein Screening aller vorliegenden Gewebeproben durchgeführt werden, von denen ein Auszug in Abb. 23 gezeigt wird. Die stärkste Bande wurde in der Probe der Vulva-Schleimhaut ermittelt, aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Diese Sequenz war in der Überprüfung mit BLAST mit CEACAM54 identisch. Deshalb wurde als nächster Schritt eine PCR aller vermeintlich positiven Gewebe mit dem 5'-3'-Primerpaar durchgeführt, um eventuelle Spleißvarianten nachzuweisen. Bei den positiven Geweben konnten zwei sinnvolle Banden lokalisiert werden, die eine bei den erwarteten 956 bp die andere bei 550 bp (Abb.23). Die kürzere Bande wurde am deutlichsten in der Vulvaschleimhaut nachgewiesen. In den anderen Geweben ist sie, wenn nur sehr schwach, zu erkennen. Beide Banden wurden ausgeschnitten und sequenziert. Beide Sequenzen konnten via BLAST als CEACAM54 identifiziert werden. Zur weiteren Analyse wurden die Amplifikate aus dem Gel extrahiert, aufgereinigt und danach mit dem StrataClone Cloning Kit kloniert, um in voller Länge sequenziert zu werden. Die beiden Amplifikate stellen zwei Spleißvarianten vom CEACAM54 dar (Abb.23).

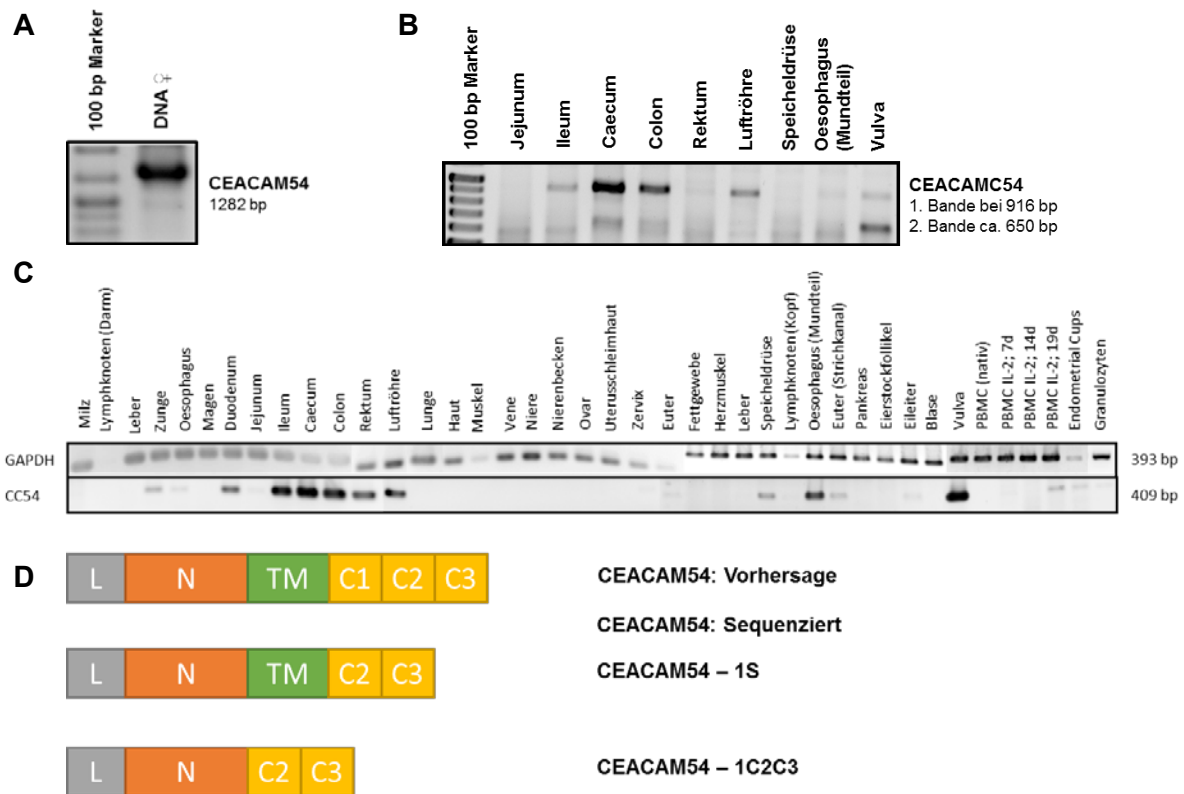


Abb.23: Expression und Struktur der Spleißvarianten von CEACAM54 in den Gewebeproben vom Pferd

Die genomische Bande des L-N-Primerpaares für CEACAM54 ist in Bild **A**. dargestellt und liegt bei den zu erwartenden 1282 bp; **B**. Eine PCR ausgewählter Gewebe der full-length-PCR-Studie für das CEACAM54, mit Banden für die membranverankerte Spleißvariante auf Höhe von 916 bp in den Darmabschnitten und der Luftröhre, sowie der sezernierten Spleißvariante auf Höhe von 650 bp deutlich in der Vulva. Andere Gewebe haben auf dieser Höhe nur sehr unscharfe Banden gebildet; **C**. Eine PCR sämtlicher auf CEACAM54 getesteten equinen Gewebeproben der Expressionsstudie mit dem L-N-Primerpaar. Hauptexpressionsorte scheinen darauf beruhend die Schleimhäute zu sein, vor allem die des Verdauungstraktes; **D**. Eine schematische Darstellung der vorhergesagten, auf Grundlage der veröffentlichten, vollständigen Sequenz für *Equus caballus* erstellten Exonstruktur und die durch Sequenzierung der detektierten Banden unter **B**. bestätigten beiden exprimierten Exonstrukturen von CEACAM54. Wobei es eine in der Zellmembran verankerte Variation mit Transmembrandomäne, aber ohne die erste zytoplasmatische Domäne gibt und eine die keine Transmembrandomäne aufweist und somit sezernierbar ist.

Die größere der beiden Banden ist eine membranverankerte Variante des CEACAM54, bei der die C1-Domäne fehlt. Das besondere hier ist der außergewöhnliche, extrazelluläre, membran-nahe Bereich. In diesen Anteil der Transmembrandomäne wurde entweder im Zuge der Duplikation oder auch später ein repetitiver DNA-Abschnitt integriert. Da dieser Bereich nicht zu einem Stopp-Codon führt, wird er auch in das Protein integriert, was dazu führt, dass direkt vor dem Transmembranbereich eine sehr prolinreiche Region entsteht. Für das Protein bedeutet das, dass es mit Hilfe dieses Bereichs deutlich aus der Membran hervorragt und die N-Domäne trägt. In der Transmembrandomäne liegt auch ein Stopp-Codon, weshalb die beiden auf mRNA-Ebene verbleibenden zytoplasmatischen Domänen C2 und C3 nicht mehr für das Protein abgelesen werden und auch hier das Signalmotiv verloren geht. Der zweiten Spleißvariante fehlt, vermutlich bedingt durch die schlechte Spleiß-Akzeptorseite, die Transmembrandomäne komplett. Zusätzlich fehlt, genau wie bei der anderen Variante, auch wieder die C1-Domäne. Durch den Verlust der Transmembrandomäne, fällt auch das dort enthaltene Stopp-Codon weg. Somit ist in dieser löslichen Variante dieses Gens der ursprünglich zytoplasmatische Teil mit dem Signalmotiv enthalten.

Die membranverankerte Spleißvariante wurde, genau wie das CEACAM50, in den pFLAG-CMV3 Vektor kloniert, um zu überprüfen, ob dieser spezielle, extrazelluläre Anteil der Transmembrandomäne überhaupt exprimierbar ist. Das Plasmid mit dem FLAG-CEACAM54 Fusionsprotein wurde in COS-7 Zellen transfiziert und nach 48 Stunden mit Antikörpern gegen das FLAG-Protein mittels Durchflusszytometrie untersucht. Das positive Resultat ist in Abb.24 dargestellt. Trotz der prolinreichen Region wird das Protein exprimiert.

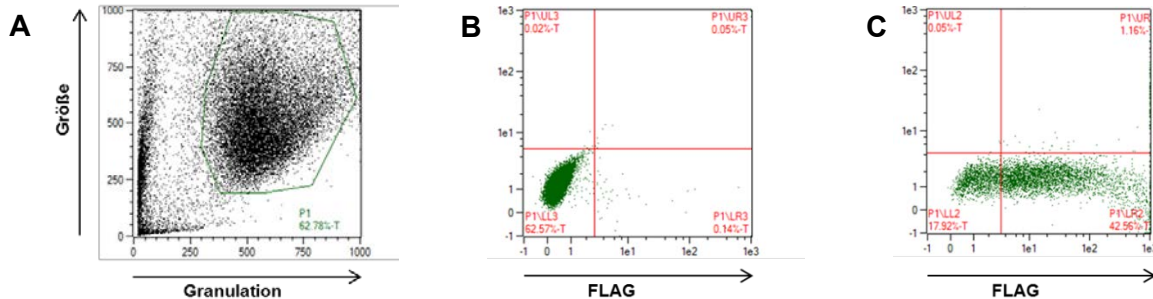


Abb.24: FACS-Analyse der Expression vom Fusionsprotein FLAG-CEACAM54: **A.** Das Gating der vitalen COS-7 Zellen, beruhend auf ihrer Größe und ihrer Granulation; **B.** Die FACS-Analyse der nicht transfizierten Wildtyp COS-7 Zellen inkubiert mit dem FLAG-Antikörper als Negativkontrolle für eine potentielle Autofluoreszenz der Zellen oder Fehlbindung des eingesetzten Antikörpers. Es lässt sich keine Expression vom FLAG-Protein nachweisen; **C.** Die FACS-Analyse der mit pFLAG-CMV3/CEACAM54 transfizierten COS-7 Zellen, 48 h nach Transfektion, markiert mit dem FLAG-Antikörper in PE-Fluoreszenz. Es lässt sich eine deutliche Expression des Fusionsproteins im Vergleich zu der Negativkontrolle unter B. nachweisen, wobei eine deutliche Streuung der Intensität besteht.

Um zu überprüfen, ob in den restlichen, mit den N-A-Primern positiv getesteten Geweben, die mit den full length Primern keine Bande gegeben haben, CEACAM54 exprimiert wird, wurde auch bei diesem Vertreter, wie schon vorher beschrieben, nach einem weiteren PolyA Signal gesucht. Auch hier befand sich ein entsprechendes Signal in dem Intron nach der Transmembrandomäne. Daraufhin wurde ein entsprechender Reverse-Primer entworfen und entsprechende Gewebe mittels RT-PCR auf die Expression von CEACAM54 untersucht (Abb.25). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, konnten nur die bereits positiv getesteten Gewebe bestätigt werden. Zusätzlich waren die dort entstandenen Banden deutlich schwächer ausgeprägt, als bei der Amplifikation mit dem 5'-3'-Primerpaar. Das lässt darauf schließen, dass eine Spleißvariante ohne zytoplasmatischen Anteil in einigen Geweben exprimiert wird, jedoch sehr schwach und nur sehr exklusiv. Die Bande des löslichen CEACAM54 wurde nicht mehr amplifiziert, diese Spleißvariante scheint nur mit den beiden zytoplasmatischen Exonen aufzutauchen.

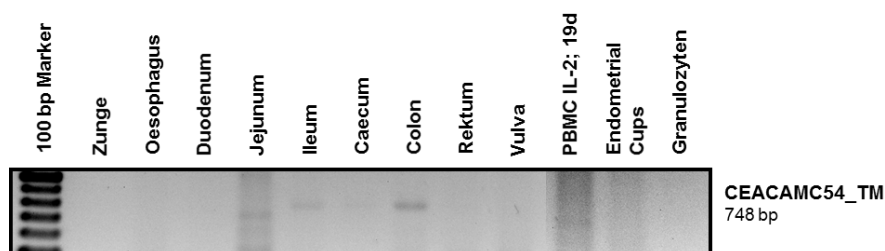


Abb.25: CEACAM54-RT-PCR mit Primern für ein potentielles Poly-A-Signal nach der Transmembrandomäne: Die Abbildung zeigt die RT-PCR mit dem Reverseprimer für das potentielle PolyA-Signal nach der Transmembrandomäne, um weitere potentielle positive Gewebe der N-A-Primer-PCR zu detektieren. Es sind schwache Banden auf der erwarteten Höhe von 748bp nur in den bereits positiv getesteten Darmabschnitten Ileum, Caecum und Colon zu detektieren. Die Bande für die lösliche Variante des CEACAM54 ist in dieser PCR verschwunden, vermutlich auf Grund der dort fehlenden Transmembrandomäne und somit fehlenden Bindungsstelle für den Reverseprimer.

Für das CEACAM54 gibt es nach den durchgeführten Analysen die zwei beschriebenen Spleißvarianten, der membranverankerten, ohne zytoplasmatischen Anteil auf Protein-Ebene und der löslichen, mit den zytoplasmatischen Domänen. Des Weiteren lässt die RT-PCR mit dem Reversprimer für ein potentiell weiteres PolyA-Signal darauf schließen, dass es ein solches mit der entsprechenden Spleißvariante in ausgewählten Geweben gibt, diese Annahme muss noch mit einer Sequenzierung der entsprechenden Bande bestätigt werden.

4.3.3 Mitglieder mit einer Transmembrandomäne und zytoplasmatischen Exonen die für ein ITAM kodieren

Im Pferd existiert nur ein Gen, das durch seine vorhergesagte Sequenz vermuten lässt, dass es ein Tyrosin basiertes aktivierendes Motiv trägt.

4.3.3.1 CEACAM41

Das CEACAM41 stellt den einzigen Vertreter der CEA Genfamilie dar, der ein aktivierendes tyrosinbasiertes Motiv in Form eines ITAMs tragen kann. Bisher konnte eine Expression von CEACAM41 nur in aktivierten Lymphozyten nachgewiesen werden. Es wurden zwei 5'-3'-Primerpaare entworfen und entsprechend an cDNA der aktivierten Lymphozyten getestet, wobei sich nur eins der beiden getesteten Primerpaare als funktionell herausstellte. Die mit diesem funktionierenden Primerpaar erhaltene Bande wurde aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Bei der Analyse der Sequenz stellte sich heraus, dass es eine Spleißvariante des Gens ist, bei der alle extrazellulären Domänen enthalten sind, jedoch die Transmembrandomäne fehlt. Neben einer Spleißform, bei der lediglich die Transmembrandomäne durch das Spleißen entfernt wurde, findet in diesem Bereich auch eine Sonderform des alternativen Spleißens statt (Abb.26). Die intakte Spleiß-Akzeptorseite der Transmembrandomäne wird beim Spleißen übersprungen, es wird jedoch auch nicht die Akzeptorstelle direkt vor der C1-Domäne genutzt, sondern eine mitten in dem Intron liegende. Somit wird ein Teil dieses Introns zusätzlich für das Protein abgelesen. Durch diese neue Sequenz, ist auch ein neues Stopp-Codon entstanden, das noch vor der eigentlich angenommenen C1-Domäne liegt. Auf Ebene der mRNA sind zwar alle vorhergesagten zytoplasmatischen Domänen enthalten, aber durch das neue Stopp-Codon werden diese nicht mehr für das entstehende Protein abgelesen. Dies bedeutet, dass das Signalmotiv auch hier nicht mehr exprimiert wird.

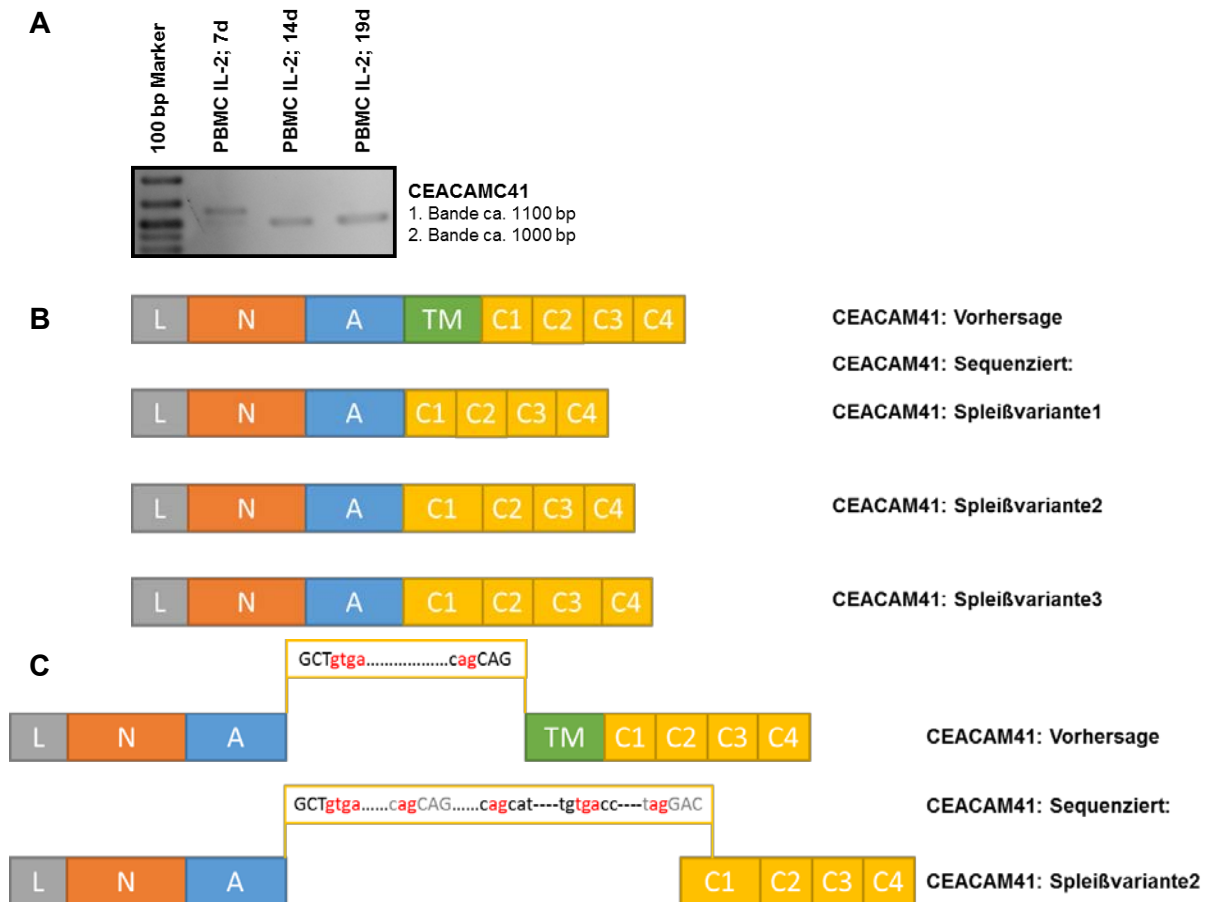


Abb. 26: Expression, Struktur und nachgewiesene Spleißvarianten von CEACAM41 im Pferd

A. Die RT-PCR mit dem full length Primerpaar für CEACAM41 zur Detektion in den Proben der aktivierten, equinen Lymphozyten, **B.** Die Exonstruktur von CEACAM41 nach Vorhersage und nach erfolgter Sequenzierung schematisch dargestellt. In der Vorhersage besteht CEACAM41 als membranverankerte Form aus einem extrazellulären Anteil mit Leader-, N- und A-Domäne, sowie einer Transmembrandomäne, der vier zytoplasmatische Domänen anhängen, die ein ITAM-Motiv tragen sollen. Sequenziert werden konnten drei unterschiedliche Spleißvarianten für das CEACAM41, denen das Fehlen der Transmembrandomäne gemein ist und die sich nur durch die variierende Größe der C1- und/oder der C3-Domäne unterscheiden. Die in zwei Spleißvarianten (2 & 3) vergrößerte C1- und in einer Spleißvariante (3) vergrößerte C3-Domäne sind auch schematisch entsprechend größer dargestellt; **C.** Eine schematische Darstellung der Entstehung von der Spleißvariante 2 des CEACAM41. Die durch eine Verschiebung des Leserahmens, dem daraus resultierendem Herausspleißen der Transmembrandomäne und der alternativen Spleiß-Akzeptorstelle im Intron zwischen TM und C1 und der daraus resultierenden Vergrößerung von C1 gebildet wird.

Zudem ist aus dem vorhergesagten membranverankerten Gen durch den Wegfall der Transmembrandomäne ein weiteres lösliches Mitglied dieser Genfamilie geworden. Um zu überprüfen, ob diese Variante des CEACAM41 trotz der starken Abweichungen, von vor allem der Spleißvarianten 2 und 3 von der vorhergesagten Struktur, exprimiert wird, wurden diese beiden Spleißvarianten in einen Expressionsvektor kloniert, in dem sie ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen GFP-Protein bilden sollten. Dadurch war es zum einen möglich nachzuvollziehen, ob das Protein abgelesen und prozessiert wird. Zum anderen hatte man durch das GFP eine durch spezifische Antikörper detektierbare Domäne geschaffen, die in einem Western Blot der Zellüberstände zu spezifischen Zeitpunkten nachgewiesen werden könnte, sollte das Protein wirklich exprimiert werden. Es wurde in zwei Ansätzen mit einer Negativ-Kontrolle transfiziert, Ansatz 1 mit der Spleißvariante 2 und Ansatz 2 mit der Spleißvariante 3 (Abb. 27). Bereits 12 Stunden nach der Transfektion war

es möglich grün-fluoreszierende COS-7 Zellen zu erkennen, hier dargestellt durch den Ansatz 1 (Abb.27A).

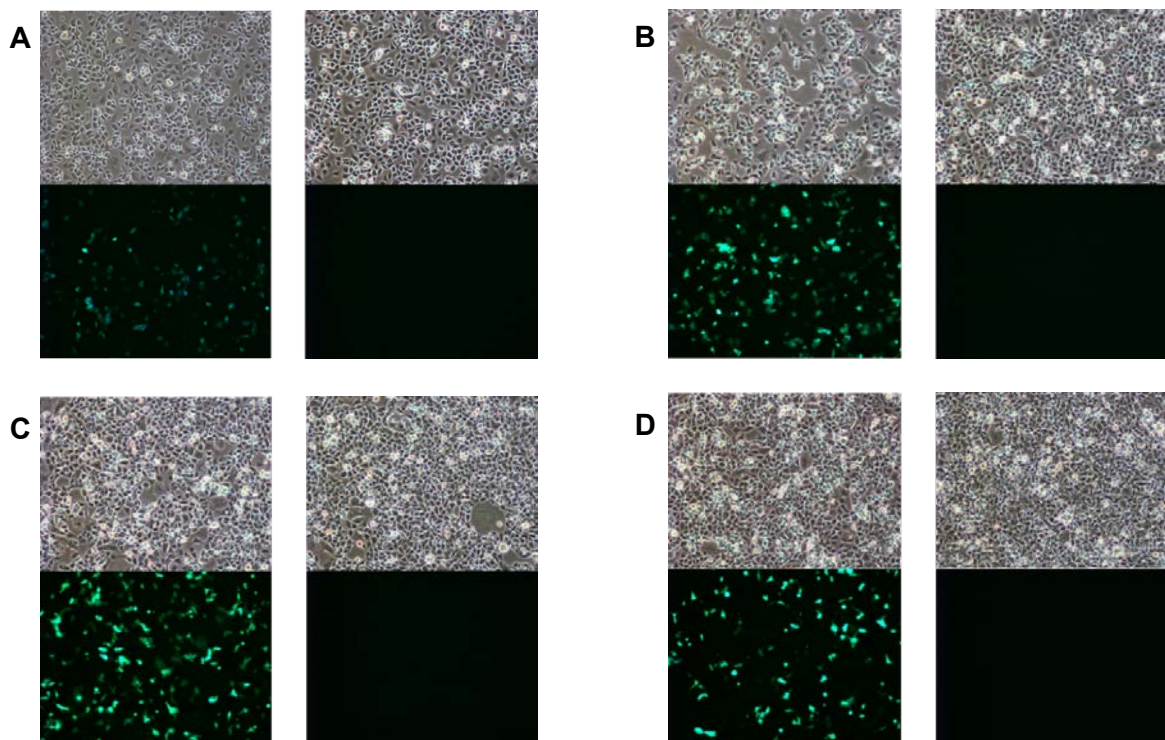


Abb. 27: EGFP-Expression nach Transfektion des Fusionsproteins CEACAM41-EGFP in COS-7 Zellen im Vergleich zu einer Negativkontrolle

A. Der rechte Block zeigt die EGFP-Expression der mit CEACAM41-EGFP transfizierten COS-7 Zellen 12 h nach Transfektion im Vergleich zu den links daneben, zur gleichen Zeit ausgesäten, Wildtyp COS-7 Zellen der gleichen Charge; **B.** Abgebildet sind die gleichen Ansätze wie in Bild A 24 h nach der Transfektion. Es ist eine deutlich gesteigerte EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen bei etwa gleich bleibender Zellzahl zu sehen; **C.** Die gleichen Ansätze 36 h nach der Transfektion. Die Intensität der GFP-Fluoreszenz zum Vorgängerbild B ist wiederum leicht gesteigert. Aber auch die Zellzahl hat sich augenscheinlich vergrößert; **D.** Die gleichen Ansätze wie zuvor nach 60 h Inkubation, die Intensität der GFP-Fluoreszenz ist bei gesteigerter Zellzahl rückgängig, vermutlich auf Grund der transienten Transfektion.

Diese Fluoreszenz legte an Intensität noch bis ca. 36 Stunden post Transfektion zu, danach stagnierte sie. Die Sequenzierung des Plasmids mit für das Fusionsprotein spezifischen Primern wurde an Proben aus der DNA-Extraktion der Klone durchgeführt. Sie ergab ein Fusionsprotein bestehend aus CEACM41 und EGFP in einem offenen Leserahmen. Somit könnte ein exprimiertes CEACAM41 im Überstand transfizierter Zellen trotz fehlendem spezifischen Antikörpers für das CEACAM41 anhand eines GFP-spezifischen Antikörpers im Western Blot detektiert werden. Diese Versuche müssten allerdings noch durchgeführt werden und waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

4.4 Sezernierte Mitglieder der equinen CEA-Familie

Die Ausprägung der CEA-Genfamilie weist im Pferd durch das Auftreten einer Vielzahl sezernierter Mitglieder der CEA-Genfamilie, der Pregnancy Specific Glycoproteins (PSGs) eine Besonderheit auf. PSGs konnten bisher nur in Spezies mit einem hämochorialen Plazentatyp nachgewiesen werden (Kahn *et al*, 1992; Teglund *et al*, 1994; Rudert *et al*, 1992; Rebstock *et al*, 1990; Zhou & Hammarström, 2001). Und für einige ihrer Vertreter konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie am Erhalt der Schwangerschaft vermeintlich beteiligt sind (Waterhouse *et al*, 2002; Lisboa *et al*, 2011; Blois *et al*, 2012), was auch zu der Bezeichnung als PSGs führte. Ihre genaue Rolle in einer fetomaternalen Kommunikation

konnte bis heute jedoch nicht nachgewiesen werden. Das Pferd bildet im Gegensatz zu den anderen Spezies mit PSGs eine epitheliochoriale Plazenta aus, eine Plazentationsart in der maternales an fetales Epithel stößt und somit der geringstmögliche Kontakt zwischen maternalem und fetalem Kreislauf besteht. Von Vertretern der Mammalia mit solcher Plazentaform ist bis heute kein Auftreten der sezernierten PSGs bekannt. Deshalb wurden die potenziellen Mitglieder beim Pferd mit besonderem Interesse untersucht.

4.4.1 Bereits bekannte sezernierte Genfamilien Mitglieder

Durch Untersuchungen des Genoms wurden Hinweise auf insgesamt neun sezernierte Mitglieder (Abb. 28) gefunden, wobei bei dem CEACAM51 davon ausgegangen wird, dass es ein Pseudogen darstellt, da keine vernünftige Leader-Domäne zu finden ist.

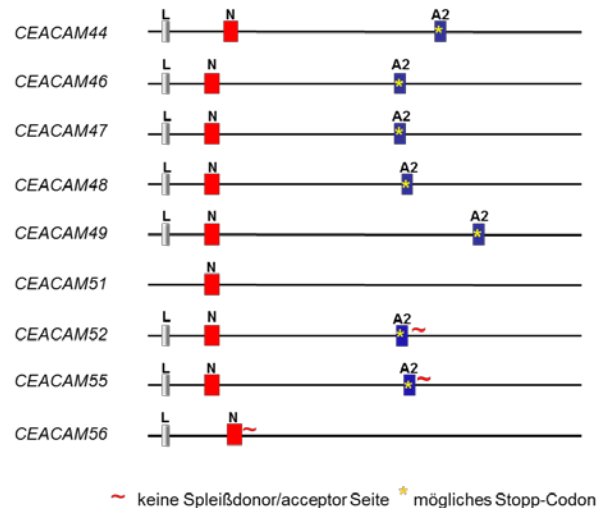
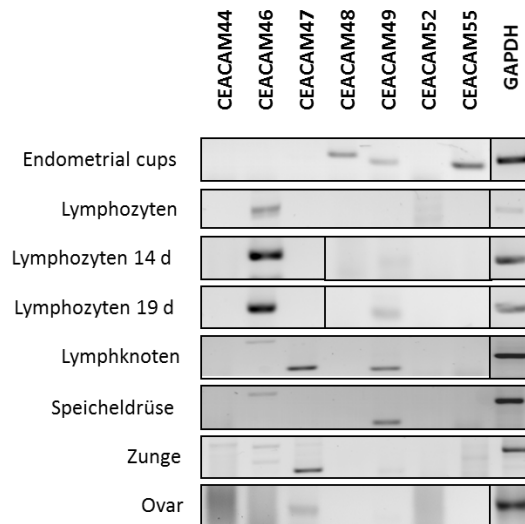


Abb. 28: Vorhergesagte Exonstruktur der sezernierbaren CEACAM1 Paraloge im Pferd (Aleksic et al, 2016)

Dargestellt ist die Genomstruktur der CEACAM1-Paraloge im Pferd, die nur aus einem extrazellulären Anteil bestehen und somit potenziell sezernierbar sind. Sie bestehen nur aus den extrazellulär gelegenen Domänen, bestehend aus Leader (grau), N-Domäne (rot) und A2-Domäne (blau). Weiterhin gekennzeichnet sind mögliche Stopp-Codons in Form eines gelben Sterns und fehlende Spleiß-Donor- oder Spleiß-Akzeptorseiten in Form einer roten Welle. Außerdem ist für CEACAM56 nach der N-Domäne im Genom kein Hinweis auf eine A-Domäne oder ähnliches zu finden, weshalb es sich wahrscheinlich um ein weiteres Pseudogen handelt.

Hierzu haben in der Arbeitsgruppe um Robert Kammerer schon ausführlichere Studien stattgefunden (Aleksic et al, 2016). Bis auf drei CEACAMs konnten alle sezernierten Mitglieder in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, wobei deutlich wurde, dass auch beim Pferd ein Hauptexpressionsort die Plazenta zu sein scheint (Kahn et al, 1992; Teglund et al, 1994; Rudert et al, 1992; Rebstock et al, 1990; Zhou & Hammarström, 2001), sie jedoch auch noch in anderen Geweben exprimiert werden (Abb. 29). Zu sehen ist, dass nur drei der sieben untersuchten, sezernierten CEACAMs von den Endometrial Cups der Plazenta exprimiert werden. Eines, das CEACAM46, wurde als sezerniertes Protein in Lymphozyten nach Aktivierung mit IL-2 nachgewiesen, ähnlich wie auch das neuerlich im Rahmen dieser Arbeit untersuchte CEACAM41. Wie in der Abb. 29 weiterhin deutlich wird, konnten das CEACAM44 und das CEACAM52 in keinem der untersuchten Gewebe nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde das ebenfalls als sezerniert vorhergesagte CEACAM56 noch gar nicht weitergehend untersucht. Diese Daten sollen nun im Rahmen dieser Arbeit ergänzt werden.



Blaschke L., 2009

Abb.29: Bisherige Ergebnisse für die sezernierten CEA-Genfamilien Mitglieder (PSGs) des Pferdes (Aleksic et al, 2016) Bisher nachgewiesene PSG-ähnliche, sezernierte CEACAMs des Pferdes sind CEACAM46, 47, 48, 49 und 55. Davon werden das CEACAM48, 49 und 55 neben anderen Geweben auch von den Endometrial Cups exprimiert; das CEACAM46 ist in aktivierten Lymphozyten zu finden. Neben der Expression von Lymphozyten, lassen sich auch CEACAMs in lymphatischem Gewebe, hier vertreten durch den Lymphknoten, nachweisen. Es handelt sich dabei um CEACAM47 und CEACAM49 von denen nur das CEACAM49 auch auf aktivierten Lymphozyten nachgewiesen werden konnte.

4.4.2 Die fehlenden, sezernierten CEACAM44, CEACAM52 und CEACAM56

Für alle drei Gene stellte sich nach den Studien von Denis Aleksic die Frage, ob die Vorhersagen aus dem Genom überhaupt stimmen und so tatsächlich im Pferdegеном vorkommen. Einen ersten Hinweis auf die tatsächliche Existenz gab die Shotgun-Sequenz des Przewalski Pferdes, die seit kurzer Zeit zugänglich war. Auch in dieser Sequenz fanden sich die gleichen Sequenzabschnitte, die für diese drei PSGs verschlüsseln sollten. Da zwei dieser CEACAMs schon ergebnislos in den vorhandenen Gewebeproben gesucht wurden, war der genomische Nachweis in der extrahierten DNA eines weiblichen Trakehners (Granulozyten) und eines männlichen Koniks (Granulozyten) die logische Herangehensweise. Für diesen Sachverhalt wurden wieder Primerpaare entworfen, die den Bereich von einem Punkt in der Leader-Region (L) bis zu einem Punkt in der folgenden N-Domäne überbrückten, außer für das CEACAM52, für das die vorhandenen N-A-Primer eingesetzt wurden. Die so entstehenden Amplifikate aus der DNA sind dann mit Größen zwischen 1500 und 2000 bp nicht zu groß, um amplifiziert und anschließend sequenziert zu werden. Das CEACAM52 ist durch die Lage der Primer mit fast 5000 bp deutlich größer, für diese Amplifikation wurden die PCR-Bedingungen angepasst, speziell die Elongationszeiten, sodass ein Nachweis möglich war. Mit diesen entsprechenden Primerpaaren konnten alle drei PSGs im Genom nachgewiesen werden und durch Sequenzierung ihre tatsächliche Existenz bewiesen werden (Abb.30). Bei nachfolgenden Expressionsstudien konnte allerdings keines der vorliegenden Gewebe als positiv für eines dieser Gene ausgemacht werden. Es bleibt also zu klären, ob und wenn ja wo und/oder zu welchem spezifischen Zeitpunkt diese Gene im Pferd exprimiert werden.

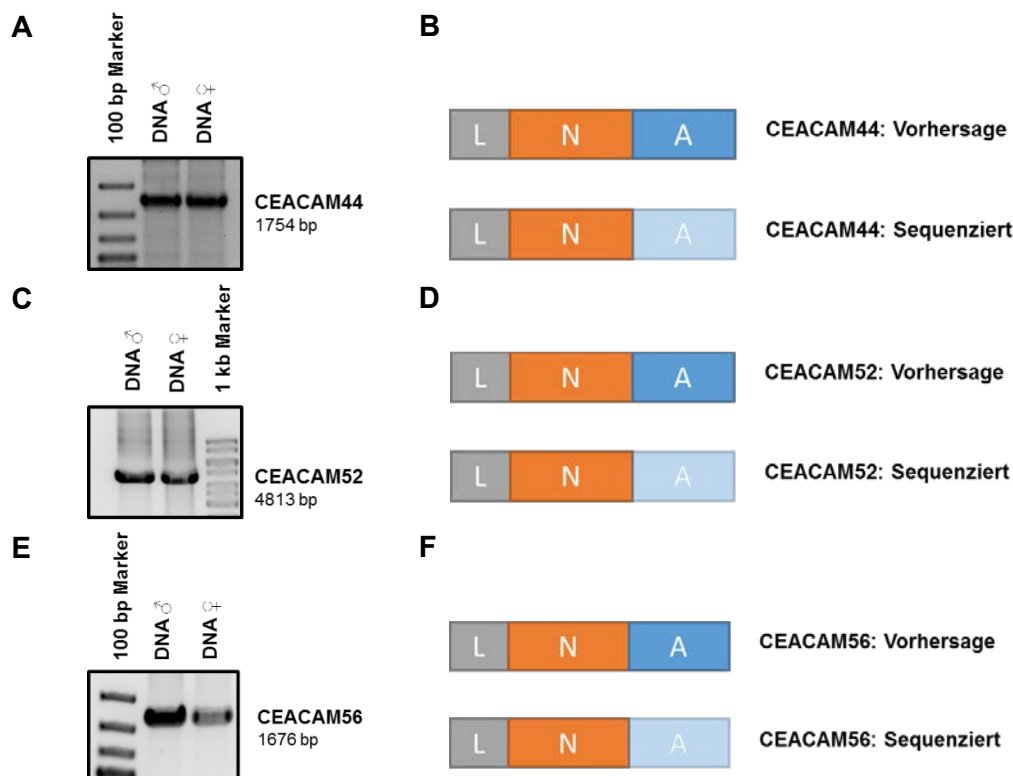


Abb.30: Struktur des CEACAMs 44, CEACAM52 und CEACAM56 nach Sequenzierung der genomischen Banden

A. genomische Bande von CEACAM44 in der Probe von männlichen und vom weiblichen Tier auf Höhe der vorhergesagten 1754 bp; **B.** Exonstruktur des vorhergesagten CEACAM44 und der bestätigte, sequenzierte Bereich von L- und N-Domäne; **C.** genomische Bande von CEACAM52 in der Probe vom männlichen und weiblichen Tier auf der erwarteten Höhe von 4813 bp; **D.** Exonstruktur des vorhergesagten CEACAM52 und der bestätigte, sequenzierte Bereich von N- und A-Domäne; **E.** genomische Bande von CEACAM56 in der Probe vom weiblichen Tier auf der erwarteten Höhe von 1676 bp; **F.** Exonstruktur von CEACAM56 laut Vorhersage und der durch Sequenzierung bestätigte Bereich von L- und N-Domäne

4.5 Expression der CEACAMs von PBMC und aktivierten PBMC

Nachdem zwei der sezernierten CEACAMs bereits in unstimulierten und aktivierten PBMCs nachgewiesen werden konnten (CEACAM41 und CEACAM46), war die Zusammensetzung der Mischkultur der Leukozyten von Interesse. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, welche Zellpopulation der Leukozyten in Mischkultur an der Expression der Mitglieder der CEA-Genfamilie beteiligt ist und wie lange die unterschiedlichen Zelltypen in Kultur überleben.

4.5.1 Charakterisierung der Lymphozytenkulturen

Die PBMCs wurden jeweils aus 50 bis 100 ml heparinisiertem Pferdeblut über die Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und wie beschrieben mit rIL-2 (Proleukin®) in RPMI-Medium in Kultur genommen. Die genauere Charakterisierung der PBMC-Mischkultur erfolgte unter Einsatz von spezifischen Primärantikörpern, die gegen spezifische Leukozytenmarker gerichtet sind zu festgelegten Zeitpunkten der Aktivierung (Tag 0, Tag 4, Tag 6, Tag 8, Tag 11, Tag 13, Tag 15, Tag 19). Diese Antikörper wurden markiert durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie an dem MACSQuant von MiltenyBiotec und dem entsprechenden Analyseprogramm MACSQuantify. Auf Grund des sehr geringen Angebots pferdespezifischer oder kreuzreagierender Antikörper, war diese Analyse nur eingeschränkt möglich. Differenziert werden konnten der Anteil der B-Zellen und der Anteil der T-Zellen, die

T-Zellpopulation konnte noch genauer nach CD4 positiven und CD8 positiven Zellen untersucht werden, die eingesetzten Antikörper können der Liste im Methodenteil entnommen werden. Innerhalb der verschiedenen Ansätze unterschieden sich die einzelnen Populationen leicht in ihrer Zusammensetzung (Tab.21). Den Hauptanteil der Kulturen bildeten die CD4-positiven Lymphozyten, die die Hälfte der extrahierten Leukozyten ausmachten (Abb.31). Die nächstgrößere Population bildeten die CD8-positiven Lymphozyten, die B-Lymphozyten spielten die gesamte Zeit eine untergeordnete Rolle und waren nach sieben Tagen Kultivierung fast vollständig verschwunden (Tab.21). Bei den frisch isolierten Leukozyten kann man mit Hilfe des Vorwärts-Seitwärts-Scatter im Durchflusszytometer noch zwei weitere Populationen der Leukozyten differenzieren (Abb.31), die Granulozyten und die Monozyten. Für Granulozyten gibt es beim Pferd keine spezifischen Antikörper. Bei Monozyten sind CD14-Antikörper beschrieben, die mit dem equinen CD14 kreuzreagieren oder eigens für das Pferd kreiert wurden, diese wurden aber im Zuge dieser Arbeit nicht eingesetzt, da sie nur als unmarkierte Antikörper (Moyo *et al*, 2013) oder nicht kommerziell (Kabithe *et al*, 2010) erhältlich sind.

Tag	Anteil B-Zellen	Anteil T-Zellen	Anteil CD4+-Zellen	Anteil CD8+-Zellen
Tag 0 (4 gemessene Ansätze)	3% - 14%	77% - 87%	36% - 49%	16% - 20%
Tag 4/5 (5 gemessene Ansätze)	3% - 13%	86% - 89%	49% - 62%	17% - 23%
Tag 6/7/8 (6 gemessene Ansätze)	1% - 13%	84% - 90%	22% - 61%	17% - 41%
Tag 11 (3 gemessene Ansätze)	0% - 11%	86% - 89%	8% - 61%	17% - 63%
Tag 13/14 (3 gemessene Ansätze)	0% - 9%	86% - 95%	5% - 50%	25% - 84%
Tag 15 (2 gemessene Ansätze)	0%	88% - 95%	2,5% - 14%	58% - 86%
Tag 19 (2 gemessene Ansätze)	0%	26% - 95%	1% - 20%	13% - 89%

Tab. 21 Zusammensetzung der PBMC-Mischkultur zu den unterschiedlichen Aktivierungszeitpunkten: Insgesamt wurden 6 Ansätze zur Aktivierung equiner PBMCs mittels humanem rekombinanten IL-2 gemacht. Die Aktivierung war unterschiedlich erfolgreich, weshalb sich unterschiedliche Kultivierungsdauern ergaben. Wie man sieht, konnten nur 2 Ansätze über die gewünschte Zeit von mehr als 2 Wochen erhalten werden. Bei den nach ca. 7 Tagen per FACS analysierten Ansätzen wird deutlich, dass die Kultur fast ausschließlich noch aus T-Zellen besteht. Und im Verlauf wird weiterhin ein deutlicher Rückgang der CD4+-Zellen ersichtlich.

Bis Tag 7 waren die PBMCs bei jedem Ansatz ohne größere Probleme unter den beschriebenen Bedingungen in Kultur zu halten. Nach diesem Zeitpunkt starben in 90% der Fälle fast alle Zellen bis Tag 14 ab. Nur in zwei Ansätzen überlebten die Zellen nach einem Einbruch um Tag 11 und begannen sich wieder zu teilen. Die vorherrschende Population waren bei beiden Ansätzen jeweils die CD8 positiven T-Zellen (Abb.32). Zu früheren Zeitpunkten bestanden die PBMCs etwa zur Hälfte aus CD4 positiven T-Zellen und nur zu knapp einem Drittel aus CD8 positiven T-Zellen. B-Zellen waren von Beginn der Kultivierung an eher in einer untergeordneten, aber mit deutlich größerer Streuung, im Vergleich zu den T-Zellen, vertreten (Abb.31). Als ausschlaggebende Population für die Expression der CEACAMs haben sich nach den vorliegenden Ergebnissen die T-Zellen in der PBMC-Mischkultur gezeigt.

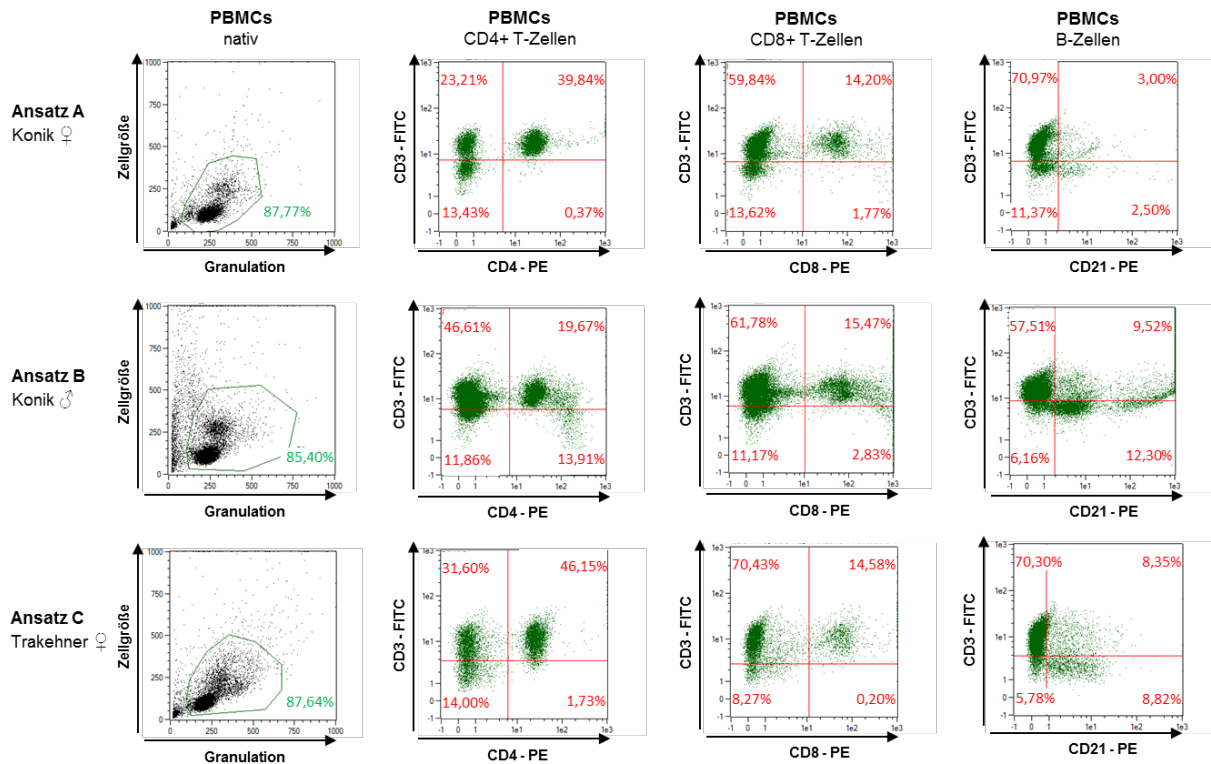


Abb. 31 FACS Ergebnisse von frisch isolierten PBMCs – Die Streuung bei verschiedenen Tieren bzw. Proben: Die Abbildung zeigt drei verschiedene Ansätze der PBMC-Kultur von drei verschiedenen Tieren, zum gleichen Zeitpunkt eines Aktivierungsansatzes (Tag 0; frisch isoliert). Das Gate für die Lymphozyten wurde auf Grund von Größe und Granulation der Zellen gesetzt. Die einzelnen Populationen wurden in verschiedenen Ansätzen mit einem spezifischen Antikörper (CD4, CD8 oder CD21) markiert und dieser wurde durch einen sekundären Antikörper PE gefärbt. Somit waren 3 Messungen für die unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen nötig. Am stärksten variierten hierbei die Menge der CD4-Zellen (Spalte 2) und B-Zellen (Spalte 4) bei den einzelnen Proben, genauso der Anteil Monozyten und Granulozyten, die als separate Kolonie in Spalte 1 neben den Lymphozyten, die auf der rechten Hälfte zu sehen sind, erscheinen. Der Anteil der CD8-Zellen scheint in allen Proben konstant zu sein. Die Tiere waren äußerlich gesund.

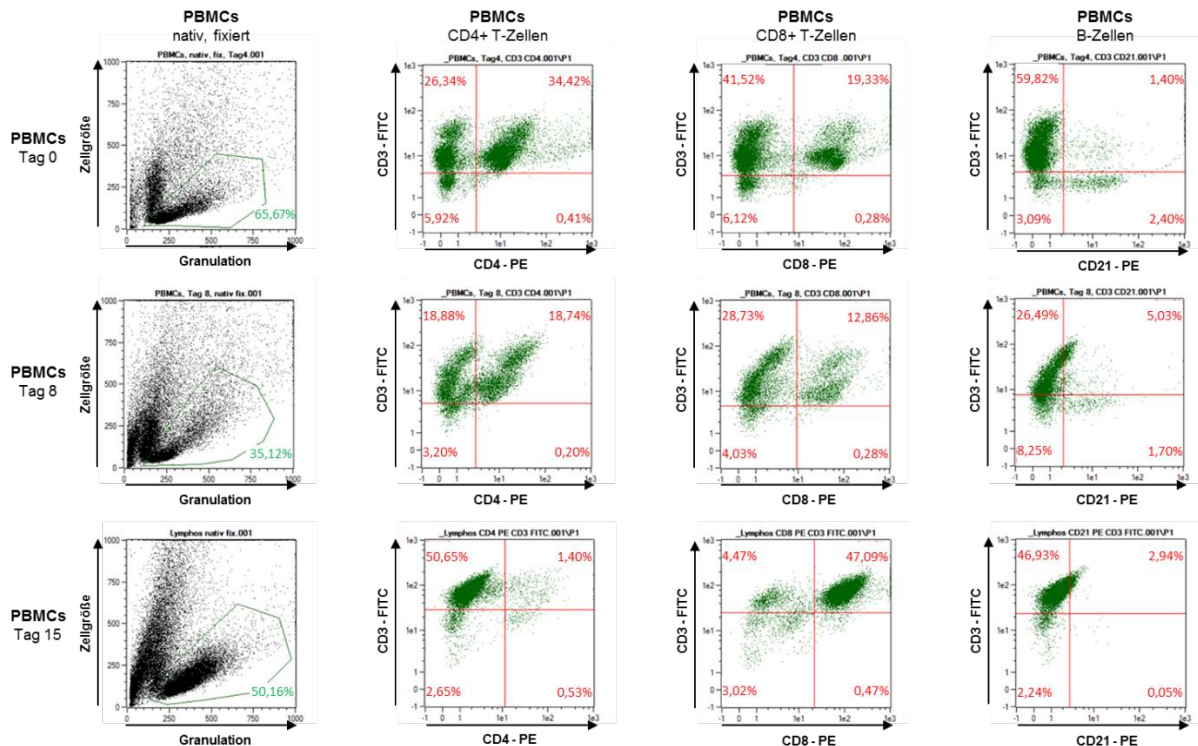


Abb.32 FACS Analysen der kultivierten PBMCs mit rhlL-2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Die Abbildung zeigt die FACS-Ergebnisse der gleichen PBMC-Kultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aktivierung mit rhlL-2. Spalte 1 zeigt das „Gating“ der gesamten PBMCs in der Kultur auf Grund ihrer Größe und Granulation lässt sich eine eindeutige Population ausmachen. Spalte 2 zeigt in der oberen Hälfte die CD3 positive Zellpopulation, die die gesamten T-Zellen beinhaltet. Im oberen rechten Quadranten sind die zusätzlich auch CD4 positiven T-Zellen, die augenscheinlich mit zunehmender Kultivierungsdauer zurückgehen. In Spalte 3 dargestellt sind im rechten Quadranten der oberen Hälfte die CD3-positiven T-Zellen, die zusätzlich auch für CD8 positiv sind und zum Ende der Kultivierung die dominierende Zellpopulation darstellen. Spalte 4 zeigt die CD3-negative, jedoch CD21 positive Zellpopulation, die die B-Zellen beinhaltet. Sie sind in dem unteren rechten Quadranten zu finden und schon innerhalb der ersten Woche der Kultivierung aus dem Zellgemisch anscheinend fast vollständig verschwunden.

4.5.2 Extraktion der T-Zellen aus der PBMC-Kultur und Analyse der Subpopulationen

Da gezeigt werden konnte, dass die T-Zellen über die gesamte Dauer der Kultivierung die vorherrschende Population bilden und somit für die Expression der CEACAMs verantwortlich sind, war darüber hinaus interessant, ob eine der beiden Subklassen CD4 und CD8 stärker oder gar spezifisch für die Expression eines oder verschiedener dieser Gene verantwortlich ist. Dazu wurden die PBMCs mit Hilfe von MicroBeads in der von MiltenyBiotec entwickelten magnetischen Separation, kurz MACS, aus der Mischkultur isoliert. Als primärer Antikörper wurde der auch schon in der Durchflusszytometrie angewendete, CD4+, bzw. der CD8+ spezifische Antikörper eingesetzt. Sekundär wurde dann ein MicroBeads tragender Anti-mouse IgG Antikörper von MiltenyBiotec eingesetzt und die PBMCs anschließend über eine magnetische Säule, wie beschrieben separiert. Die erhaltenen aufgereinigten Lymphozyten wurden anschließend in der Neubauer Zählkammer gezählt und ein Teil für das Durchflusszytometer mittels Färbung mit dem PE-Antikörper aufbereitet, um die Reinheit der erhaltenen Population überprüfen zu können (Abb.33, Abb.34). Von den restlichen CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten wurde die RNA isoliert und für die PCR aufbereitet, um zu überprüfen, wer für die Expression der PSGs verantwortlich ist.

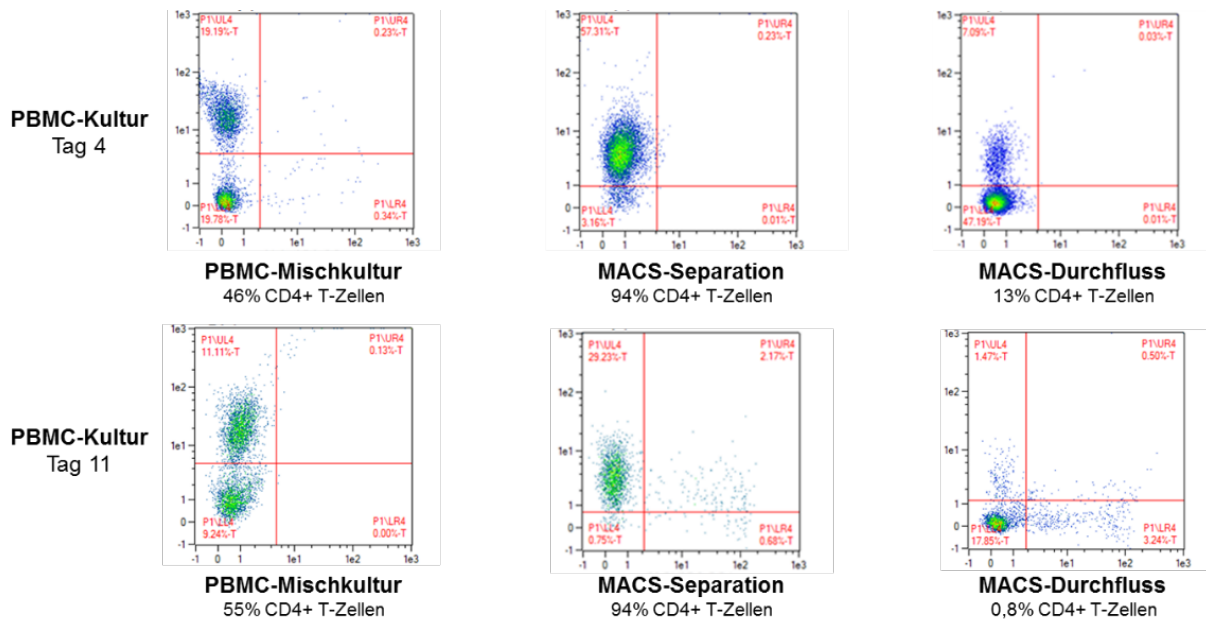


Abb.33 FACS-Analyse der MACS separierten CD4+ T-Lymphozyten

Stellvertretend für die MACS-separierten Subpopulationen der T-Zellen sind hier die FACS-Analysen der separierten CD4+ T-Zellen aus der PBMC-Mischkultur zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Aktivierung mit rhIL-2 zu sehen. Eine FACS-Analyse wurde der MACS-Separation angeschlossen, um den Reinheitsgrad der isolierten Population zu bestimmen. In Spalte 1 ist jeweils die Ausgangspopulation mit dem Anteil an CD4+ T-Zellen dargestellt, die ungefähr die Hälfte der Zellen ausmachen. Spalte 2 zeigt die durch Separation aufgereinigten CD4+ T-Zellen, die nun über 90% der Zellsuspension ausmachen. Und in Spalte 3 wird der CD4+ arme Durchfluss gezeigt, aus dem fast sämtliche CD4+-Zellen verschwunden sind. Die aufkonzentrierten Zellen wurden für weitere Analysen verwendet.

Es gelang dabei den Anteil von CD4 positiven Zellen zu verdoppeln, von etwa 50% in der Ausgangskultur auf über 90% nach der Aufreinigung. Bei der Aufreinigung an Tag 4 gingen aber auch große Anteile der CD4-Population verloren, wahrscheinlich bedingt durch eine Überlastung der Säule, bei der die Aufnahmekapazität überschritten war (Abb.33). Um diese Zellen auch noch zu gewinnen, könnte man den Durchfluss erneut über eine MACS-Separationsäule geben. Die CD8 positiven Zellen konnten um ein dreifaches von etwa 25% in der Ausgangskultur auf etwa 80% konzentriert werden (Abb.34). Mit diesen aufgereinigten Zellen lassen sich nun genaue Aussagen über das Expressionsmuster der T-Zell-Subklassen treffen.

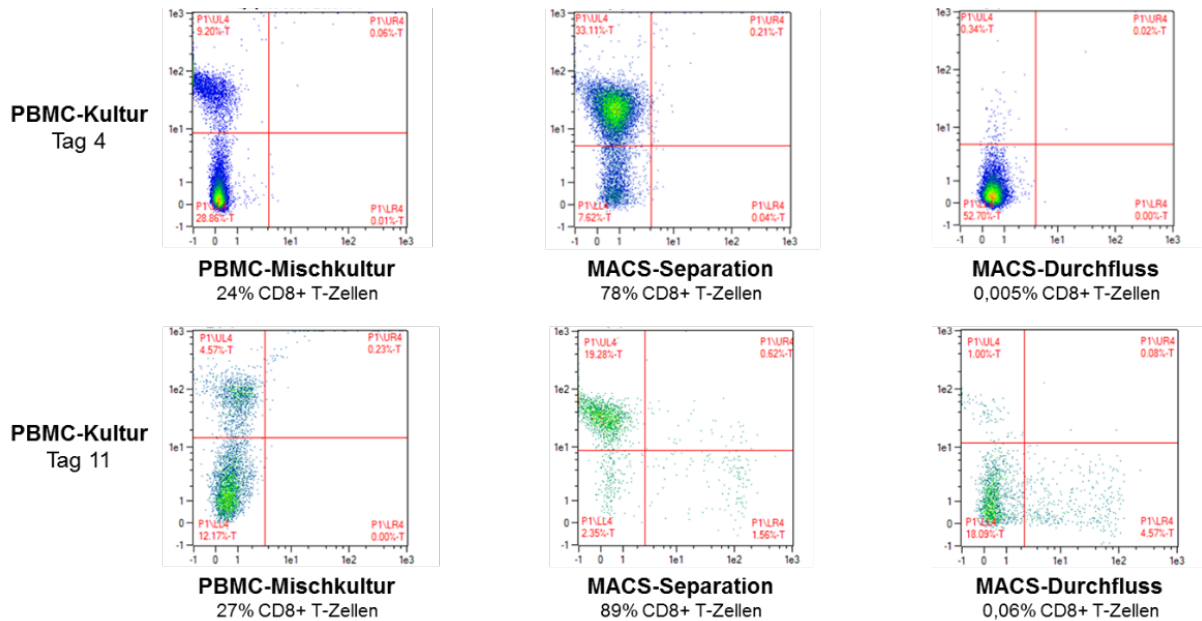


Abb.34 FACS-Analyse der MACS separierten CD8+ T-Lymphozyten

Stellvertretend für die MACS-separierten Subpopulationen der T-Zellen sind hier die FACS-Analysen der separierten CD8+-Zellen aus der PBMC-Mischkultur an Tag 4 und Tag 11 der Aktivierung mit rIL-2 zu sehen. In beiden Durchgängen konnte die Menge der CD8+ T-Zellen um mehr als ein 3faches des Ursprungswertes angereichert werden, wie man in Spalte 2 deutlich erkennen kann im Vergleich zur Ausgangssituation in Spalte 1. Die durch MACS-Separation erreichte Reinheit beträgt zwischen 80 – 90%. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Separation sind im Gegenzug in der Durchfluss-Probe in Spalte 3 nahezu keine CD8+ T-Zellen mehr nachzuweisen.

4.5.3 Sauberkeit der PBMC-Aufreinigung

Der Versuch der MACS-Separation wurde bei insgesamt zwei Ansätzen der PBMCs zu einheitlichen Zeitpunkten durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich getestet, wie gut die Aufreinigung der Kultur nach ein- oder mehrmaliger Separation über die magnetische Säule war. Dazu wurde für jeden Aufreinigungsdurchgang eine neue Säule eingesetzt und anschließend das Ergebnis mit dem MACSQuant ermittelt.

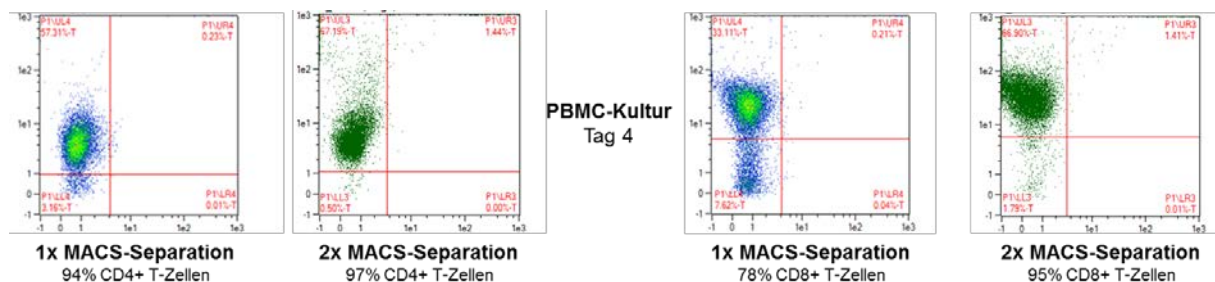


Abb.35 FACS-Analysen der MACS-Separation der Lymphozyten nach einfacher und doppelter Aufreinigung

Stellvertretend für die verschiedenen MACS-Separationsansätze sind hier die einzelnen Zellpopulationen CD4+ und CD8+ nach einmaliger Aufreinigung (je linkes Bild) und zweifacher Aufreinigung (je rechtes Bild) über die magnetische Säule gezeigt. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden im Anschluss via FACS analysiert, um den Effekt der Separierung zu überprüfen. Der Effekt einer zweifachen Aufreinigung ist bei den separierten CD8+ T-Zellen deutlicher zu erkennen, als bei den CD4+ T-Zellen. Die zweimalige Filterung über die Säule macht bei den CD4+-Zellen lediglich eine 3%ige Steigerung aus, wohingegen eine Steigerung um fast 20% bei den CD8+-Zellen erreicht werden konnte.

Schon nach einmaliger Aufreinigung war das Ergebnis für die hier durchgeführten Versuche zufriedenstellend und lag bei knapp 80 bis 90% für die CD8+ T-Zellen und bei über 90% für die CD4+ T-Zellen. Für eine > 95%ige Aufreinigung hat bei diesen Ansätzen schon der Einsatz von 2 Säulen gereicht (Abb.35). Dass eine doppelte Aufreinigung in bestimmten Fällen sinnvoll ist, lässt sich bei den CD8+ T-Zellen sehr deutlich zu erkennen. Von den vorhergehenden FACS-Analysen weiß man schon, dass sie den kleineren Anteil der Lymphozyten-Population stellen und daher vermeintlich stärker verunreinigt werden können, als die ohnehin stark vertretenen CD4+ T-Zellen. Deshalb sind die CD4+ T-Zellen schon nach einmaliger Aufreinigung sehr rein, wohingegen der zweite Aufreinigungsschritt für die CD8+ T-Zellen nochmal eine deutliche Verbesserung aufzeigt. Die Arbeit lohnt sich also, wenn bekannt ist, dass die Zielzellen nur einen geringen Anteil an der Gesamtpopulation stellen.

4.6 Expression der CEACAMs in Lymphozytensubpopulationen

4.6.1 Sezernierte, PSG-ähnliche CEACAMs

Zu jedem Zeitpunkt der Durchflusszytometrie und Zellseparation wurde auch ein Teil der PBMCs und der aufgereinigten Lymphozyten zur RNA-Isolation genutzt, um sie weitergehend untersuchen zu können, vor allem in Bezug auf ihre CEACAM-Expression. Mit Hilfe der Reversen Transkription (Two-Step-Methode) wurde die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe einer GAPDH-PCR wurde überprüft, ob cDNA vorhanden ist. Für alle bereits nachgewiesenen PSG-ähnlichen CEACAMs wurde eine PCR zur Überprüfung ihrer Expression in den cDNA-Proben der PBMC-Mischkultur und der cDNA der aufgereinigten Lymphozyten durchgeführt. Weitestgehend konnten mit diesen PCRs die Ergebnisse aus Abb. 31 in Bezug auf die Expression in Lymphozyten bestätigt, CEACAM46 konnte auf aktivierten Lymphozyten nachgewiesen werden. Jedoch wurde CEACAM46 in den hier durchgeführten Studien nicht nur durchgehend auf den aktivierten, sondern auch auf den frisch isolierten Lymphozyten nachgewiesen, wobei die Expressionsstärke ausgehend von der Bandenstärke ab Tag 11 zunimmt. Auch diese Ergebnisse stimmen mit den vorangegangenen Ergebnissen (Aleksic, D., 2010) überein. Jedoch wurden dort lediglich die späteren Aktivierungszeitpunkte der Lymphozytenkultur analysiert und die frühen Zeitpunkte der Aktivierung wurden mit den hier durchgeführten Studien ergänzt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Gen sowohl von den CD4+, als auch von den CD8+-Lymphozyten fast gleich stark exprimiert wird (Abb.36). Auch für das CEACAM48 (nicht abgebildet) konnten die früheren Ergebnisse in Bezug auf die PBMCs bestätigt werden, es wird zu keinem untersuchten Zeitpunkt von den Lymphozyten exprimiert. Jedoch konnte auch für das CEACAM49 zu keinem Zeitpunkt der Aktivierung eine Expression nachgewiesen werden (Abb.36), anders als in den Studien von Denis Aleksic, 2010, in denen es den Anschein hatte, dass CEACAM49 zu einem späten Aktivierungszeitpunkt exprimiert wird. Das als sezerniert entdeckte CEACAM41 wird erst ab dem 4. Kultivierungstag verstärkt auf Lymphozyten exprimiert, aber auch bei den frisch isolierten Lymphozyten ist eine schwache Bande zu erkennen. Nach Tag 11 nimmt die Expression bis Tag 19 dann wieder ab (Abb.36). Zusätzlich konnte man zeigen, dass die CD4+-Lymphozyten dieses PSG stärker exprimieren und die CD8+-Lymphozyten nur schwach, was eventuell auch der Grund ist, warum nach Tag 11 die Expression nachlässt, denn zu diesem Zeitpunkt beginnen die CD4+-Zellen aus der Kultur zu verschwinden.

Eine Neuentdeckung war die Expression von CEACAM55 auf Lymphozyten, dieses Gen wird allerdings nur auf den, zuvor nicht untersuchten, früh-aktivierten PBMCs gebildet (Abb.36). Eine wirklich starke Expression findet nur bis Tag 4 der Kultivierung statt, an Tag 8 und Tag 11 lassen sich noch ganz schwach Banden erkennen. Bei den aufgereinigten Lymphozyten ist eine starke Bande nur bei den CD4-positiven T-Zellen an Tag 4 der Aktivierung zu sehen. Dieses Gen ist somit auch das Einzige, welches sowohl in Lymphozyten, als auch auf Endometrial Cups nachgewiesen werden konnte.

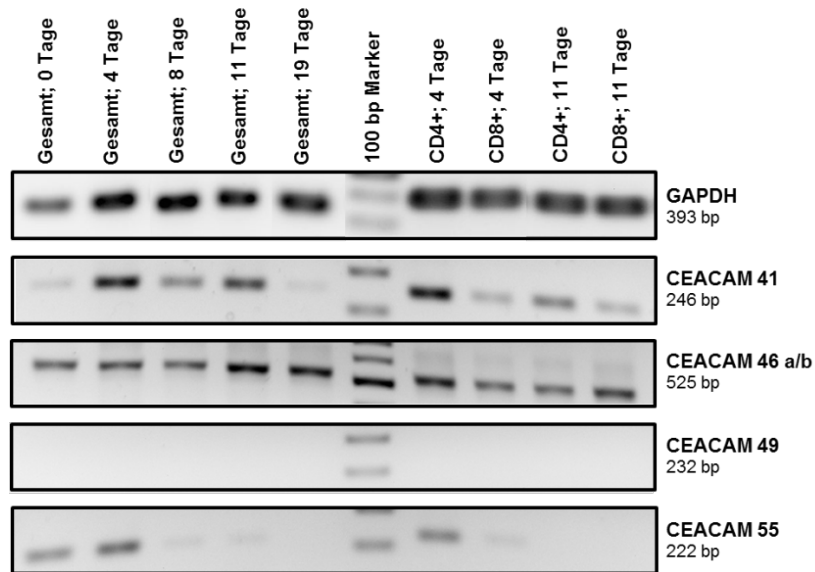


Abb.36: Expression sezernierter, PSG-ähnlicher CEACAMs in der Lymphozytenkultur

Von oben nach unten: die erste Reihe zeigt die PCR zur Expression der GAPDH zur Überprüfung der erfolgreichen RT-PCR. Die frisch isolierten Lymphozyten an Tag 0 geben eine schwächere Bande als die anderen Proben, folglich ist weniger cDNA in der Probe, die Ursache ist unbekannt, lässt aber Rückschlüsse bei potenziell schwächeren Banden folgender PCRs zu. In Reihe 2 bei der Expressionsanalyse von CEACAM41 sieht man eine deutliche gesteigerte Expression von Tag 1 zu Tag 4, diese bleibt bestehen bis Tag 11. An Tag 0 und zum Ende zu Tag 19 ist die Expression eher schwach. Bei der vergleichenden PCR der T-Zell-Subpopulationen ist ein deutlicher Unterschied der Expression von CEACAM41 zu sehen. Es wird von CD4+ im Gegensatz zu den CD8+-Zellen stärker exprimiert. CEACAM46 in Reihe 3 wird über die gesamte Zeit der Kultivierung und von beiden Lymphozyten-Subpopulationen gleichermaßen exprimiert, ab Tag 11 nimmt die Expressionsstärke anscheinend noch etwas zu. CEACAM49 in Reihe 4 wird nicht auf den hier untersuchten PBMCs exprimiert. CEACAM55 in der letzten Reihe zeigt bei frisch isolierten und 4-Tage-alten Lymphozyten eine deutliche Expression, die maßgeblich von den CD4+ kommt und dann deutlich nachlässt.

Von CEACAM46 konnte in einer Expressionsstudie mit dem full length Primerpaar für das Gen in der aktivierten PBMC-Mischkultur eine zweite Spleißvariante nachgewiesen werden. Auf dem Gel bildeten sich zu jedem überprüften Zeitpunkt zwei Banden aus, die extrahiert und sequenziert wurden (Abb.37). Die obere der beiden Banden ist die schon bekannte Variante des CEACAM46 mit den beiden Variationen CC46a und CC46b. Die untere der beiden Banden stellt eine besondere, zuvor noch nicht nachgewiesene Spleißvariante dieses Gens dar, die eine verkürzte N-Domäne aufweist. Bei näherem Betrachten der entstandenen Sequenz und den daraus resultierenden Spleißstellen, konnte eine eindeutige Spleiß-Akzeptorstelle ausgemacht werden, allerdings existiert keine wirkliche Spleiß-Donorstelle (Abb.37). Somit kann das Zustandekommen dieser Spleißvariante nicht schlüssig aufgeklärt werden. Doch auch bei wiederholter Durchführung dieser PCR blieb es bei der Ausbildung dieser Doppelbande. Durch das Spleißen bedingt, wird auch das Leseraster verschoben und es kommt zu einem sehr frühen Stopp-Codon am Übergang von der N- zur A-Domäne (Abb.37), was die Funktionalität dieser Variante in Frage stellt.

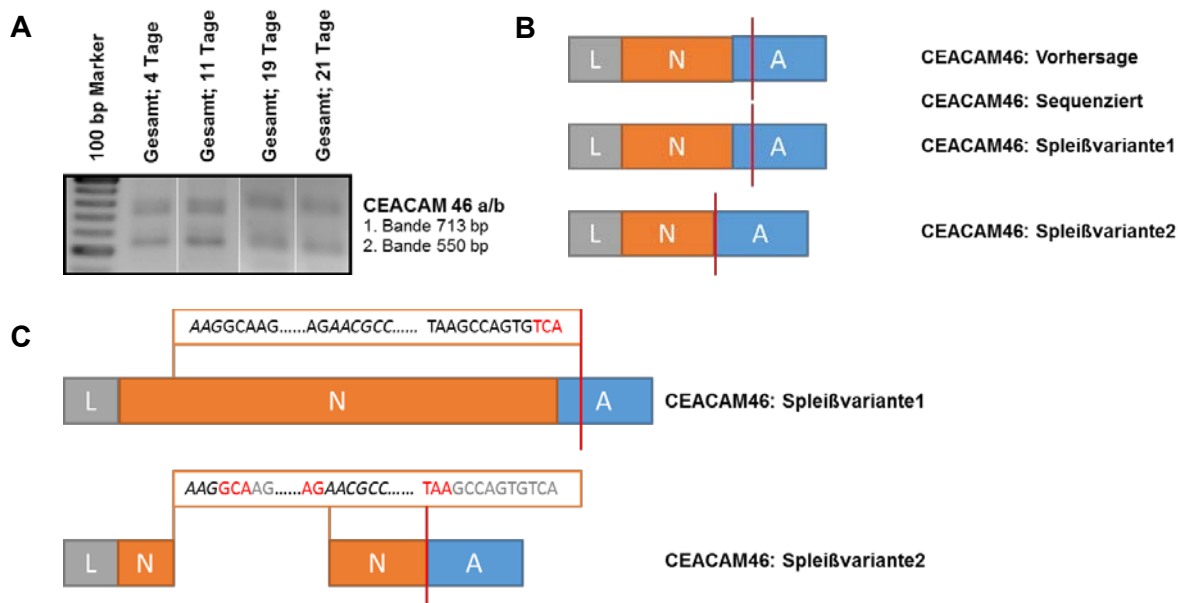


Abb. 37: Nachgewiesene Spleißvarianten von CEACAM46 in den isolierten und aktivierten PBMCs

A. Expressionsstudie für das CEACAM46-Gen auf den aktivierten PBMCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Aktivierung, deutlich zu sehen ist die Doppelbande für das CEACAM46 zu jedem Zeitpunkt einmal auf der erwarteten und bestätigten Höhe von 713bp und einmal deutlich darunter auf einer Höhe von etwa 550bp. **B.** Eine schematische Darstellung der beiden nachgewiesenen Spleißvarianten von CEACAM46 im Vergleich zur vorhergesagten Variante. Wobei die als „Spleißvariante1“ bezeichnete Variation die bereits bekannte Variante darstellt, die der vorhergesagten Struktur mit dem als rotem Strich markierten Stopp-Codon entspricht. Die als „Spleißvariante 2“ bezeichnete Variation, die die bisher nicht bekannte Variation ist, die eine verkürzte N-Domäne besitzt und daraus resultierend auch ein anderes Stopp-Codon. **C.** Die mögliche Entstehung der Spleißvariante2 mittels Schema mit den rot markierten Schnittstellen und dem neuen, ebenfalls rot markierten Stopp-Codon, die mit Hilfe des Alignments ermittelt werden konnten.

4.6.2 Membranverankerte CEACAMs in der Lymphozytenkultur

Neben den sekretierten CEACAMs konnten auch drei der membranverankerten CEACAMs auf den PBMCs bestätigt werden (Aleksic, D.), die CEACAM1, CEACAM43 und CEACAM45. Auch für diese Vertreter wurden Expressionsstudien entsprechend denen der Sezernierten durchgeführt (Abb.38). Dabei fanden sich das CEACAM1 und das CEACAM43 zu allen untersuchten Zeitpunkten in etwa gleichbleibender Intensität auf den Proben der PBMC-Mischkultur, wohingegen das CEACAM45 zum frühen Zeitpunkt der Aktivierung deutlich exprimiert wird und dann stetig schwächere Expression zeigt. An Tag 19 ist es gar nicht mehr zu detektieren, im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen (Aleksic, D., 2010). Auf den sortierten Lymphozyten lässt sich für keines der untersuchten membranverankerten CEACAMs eine Präferenz für eine der beiden T-Zell-Subpopulationen (CD4+ vs. CD8+) ausmachen. CEACAM1 und CEACAM43 werden gleich stark von beiden Subpopulationen der T-Zellen exprimiert (Abb.38), einzig CEACAM45 scheint von anderen Zellen der PBMC-Mischkultur als den T-Lymphozyten exprimiert zu werden. Weder auf den CD4+ T-Zellen, noch auf den CD8+ T-Zellen lässt sich eine Expression detektieren, obwohl in den Proben der PBMC-Mischkultur zu den entsprechenden Zeiten eine klare Bande für das CEACAM45 zu sehen ist.

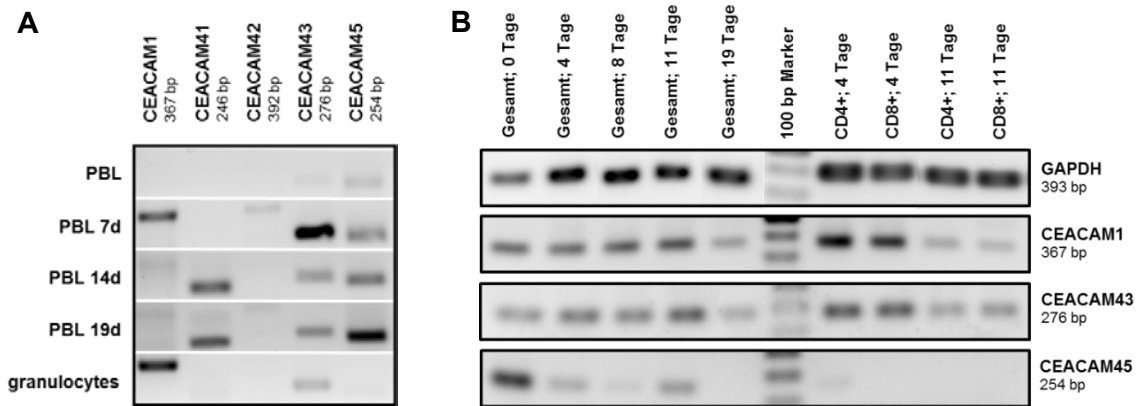


Abb. 38 Expression von membranverankerten CEACAM in den isolierten Lymphozyten

In Bild A zu sehen sind die Ergebnisse der Bachelorarbeit von Denis Aleksic. CEACAM1 wurde nur auf den 7 Tage alten Lymphozyten und Granulozyten gefunden, CEACAM43 konnte hingegen durchgängig auf Lymphozyten und Granulozyten nachgewiesen werden. CEACAM45 wird mit zunehmender Aktivierung von Lymphozyten stärker exprimiert. Zusätzlich ist die Expression von CEACAM41 auf aktivierten Lymphozyten dargestellt, sowie eine schwache Bande für CEACAM42 bei 7 Tage-aktivierten Lymphozyten. B. Für das CEACAM43 konnten die Daten aus Abbildung A bestätigt werden, es wird durchgängig auf Lymphozyten exprimiert. Zusätzlich konnte eine gleichstarke Expression von CEACAM43 von CD4+ und CD8+ nachgewiesen werden. Genauso verhält es sich mit CEACAM1. Im Gegensatz zu Abbildung A fanden wir eine durchgehende Expression in CD4+ und CD8+ T-Zellen. CEACAM45 wird, im Gegensatz zu den Studien von Abbildung A, mit zunehmender Aktivierung der Lymphozyten weniger stark exprimiert und ist weder auf den CD4+ noch auf den CD8+ zu detektieren.

4.6.3 Expression der beschriebenen Mitglieder der CEA-Genfamilie auf Granulozyten und Endometrial Cups

Die Expression der membranverankerten Mitglieder der CEA-Genfamilie, die auf den PBMCs nachgewiesen wurden, und die der sezernierten PSGs wurden für das Pferd schon ausführlich in der AG Kammerer untersucht. Die jetzt getätigten Studien sollten die vorhandenen Ergebnisse entsprechend bestätigen (Aleksic, D.; 2010, Aleksic *et al*, 2016). Die Studien wurden mit den N-A-Primerpaaren, bzw. L-N-Primerpaaren für die jeweiligen CEACAMs durchgeführt und es konnten damit alle vorangegangenen Ergebnisse bestätigt werden. Das CEACAM1 findet man sowohl in Endometrial Cups exprimiert, als auch in Granulozyten, wobei die Granulozyten eine stärkere Expression zeigen (Abb. 39). Das CEACAM45 lässt sich vorrangig noch auf den Endometrial Cups nachweisen, die entstandene Bande bei den Granulozyten ist nur sehr schwach. Neben den Lymphozyten wird das CEACAM43, wie das CEACAM1 auch, zusätzlich noch von Granulozyten exprimiert, auf den Endometrial Cup ist es allerdings nicht zu finden. Genauso verhält es sich auch bei dem CEACAM46, für das einzig bei den Granulozyten eine spezifische Bande nachgewiesen werden konnte (Abb.39). Die Doppelbande, die für dieses Gen bei den Endometrial Cups entstanden ist, unterscheidet sich von der spezifischen Bande der Granulozyten und wird auf ein Fehlpriming der entsprechenden Primer in diesem Gewebe zurückzuführen sein. Ein anderes Bild ergibt sich für die CEACAM 49 und 55, deren Vorhandensein auf den Endometrial Cups bestätigt werden konnte. Allerdings sind beide, wie auch schon zuvor festgestellt wurde (Aleksic *et al*, 2016), nicht auf Granulozyten exprimiert. CEACAM 41 wird, wie auch das CEACAM1, sowohl von den Endometrial Cups, als auch von den Granulozyten exprimiert, wobei auch hier die Expression auf den Granulozyten sehr viel deutlicher ausfällt, gemessen an der Intensität der Bande (Abb.39).

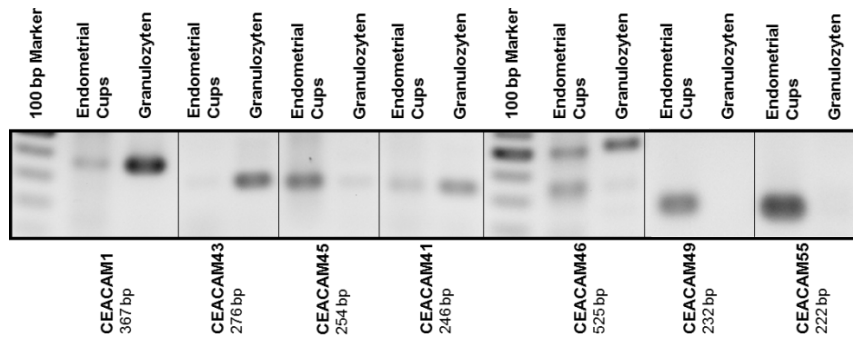


Abb.39 Expression ausgewählter Mitglieder der CEA-Genfamilie auf Endometrial Cups und Granulozyten: Die Abbildung bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse von Denis Aleksic. Die Endometrial Cups exprimieren CEACAM1 schwach, CEACAM45 deutlich, CEACAM41 schwach, CEACAM49 und CEACAM55 deutlich. Die Bande von CEACAM46 bei den Endometrial Cups liegt mit 500 bp nicht ganz auf der erwarteten Höhe von 525bp und konnte durch Sequenzierung als Fehlpriming bestätigt werden. Nur die Bande bei den Granulozyten stellt wirklich CEACAM46 dar. Es fällt auf, dass die Granulozyten eher die membranverankerten Gene, wie CEACAM1, 43 und 45 exprimieren. Darüber hinaus werden aber auch noch die sezernierten CEACAM41 und 46, die auch auf Lymphozyten zu finden sind, von den Granulozyten exprimiert.

5 Diskussion

5.1 Eingesetzte Methoden

5.1.1 Gewebeproben für die Expressionsstudien

Anders als bei dem Labortier Maus, bei dem man unmittelbar nach der Tötung in der Lage ist die gewünschten Gewebeproben zu entnehmen, besteht diese Möglichkeit beim Großtier nur sehr selten. Die hier verwendeten Proben wurden bei Schlachttieren nach der Schlachtung (nicht unmittelbar) und bei der Sektion von zur pathologischen Untersuchung eingesandten Tieren entnommen. Das Problem hierbei ist, dass die Konservierung und der Schutz vor dem Abbau durch RNAsen erst zu dem Zeitpunkt greifen, an dem die Proben in RNAlater kommen. Und da das nicht unmittelbar nach der Tötung passieren konnte, konnte es schon zur Degradierung der RNA kommen. Das verringert die Qualität der Gewebe für den Nachweis der mRNAs teilweise massiv, zum Beispiel bei dem sich selbst lysierenden Pankreas. Zum anderen sind bestimmte Gewebe, wie zum Beispiel das Innenohr des Pferdes deutlich schwieriger zu präparieren, als bei den üblichen Labortieren, wie der Maus, was die Überprüfung der Expression an diesen durchaus erschwert. Es wäre zu überlegen noch einmal einzelne, ausgewählte Gewebeproben in möglichst frischem Zustand zu entnehmen und diese auf die CEACAM Expression zu überprüfen.

5.1.2 Einsatz der Two-Step-RT-PCR

Im Gegensatz zu den erhältlichen One-Step-RT-Kits ist ein deutlich höherer Einsatz von RNA notwendig für die Erzeugung der cDNA. Bei manchen (zellärmeren) Geweben ist die adäquate Isolierung ausreichender RNA-Mengen allerdings nicht möglich, um die geforderte Menge für die Erzeugung der cDNA zu erreichen. Bei solchen Geweben sollte in Erwägung gezogen werden, die Expression der CEACAMs mittels One-Step-RT-PCR zu überprüfen. Die Proben hier wurden per Hand in den Thermoblocks umgesetzt. Es gibt auch die Möglichkeit, diese Schritte durch ein Programm im Thermocycler zu ersetzen. Durch den Einsatz eines Cyclers an dieser Stelle ist vielleicht eine zeitgenaue, präzisere Einstellung der Temperatur für die einzelnen Schritte möglich. Da es aber an dem Ergebnis voraussichtlich nichts ändern würde, wurde an dieser Stelle auf das im Labor erprobte und zuverlässige Verfahren zurückgegriffen.

Der Einsatz von Random-Primern, anstatt an erster Stelle von den spezifischen Primern, hat hingegen den Vorteil, dass man den potentiellen Einsatz von mRNA verringert, da man die gesamte, in der Probe enthaltene, mRNA umschreibt und erst von der cDNA die spezifische PCR für die einzelnen Mitglieder der CEA-Genfamilie durchführt. Dadurch ist es auch möglich die Qualität der cDNA anhand von dem Housekeeping-Gen GAPDH zu überprüfen.

5.2 Die Lymphozyten Mischkultur von aus Vollblut isolierten PBMCs

5.2.1 Kultivierung der equinen Lymphozyten

Bei der Isolierung von Lymphozyten aus den Blutproben von klinisch gesunden Tieren, wie sie hier verwendet wurden, erlangt man in der Regel ruhende Zellen, die sich in der G₀-Phase ihres Zellzyklus befinden und erst nach Kontakt mit einem spezifischen Antigen wieder zur Proliferation übergehen, wobei hier jeweils nur ein kleiner Anteil der Gesamtpopulation reagiert (Janeway Immunologie; 2014). Es gibt in der Literatur beschrieben verschiedene Ansätze primäre, frisch aus dem Blut isolierte Lymphozyten zu kultivieren, die nicht durch die Aktivierung über Antikörper funktionieren und dafür eine größere Menge, bis hin zu allen Lymphozyten der Population, zur Proliferation anregen. Die meisten beruhen darauf, dem Medium zur Stimulation der Lymphozyten ein Mitogen (ConA, PHA, PWM, LPS) zuzusetzen, welches Lymphozyten unterschiedlichster klonaler Herkunft zur Zellteilung anregt, weshalb diese Mitogene auch als polyklonal bezeichnet werden (Janeway Immunologie, 2014). Jedoch kann man auch mit diesen Zusätzen, außer mit PWM, nicht alle Klassen der Lymphozyten ansprechen, so wirkt beispielsweise PHA eher auf die T-Zell-Population und LPS dafür auf die B-Zellen (Janeway Immunologie, 2014). Es gibt auch speziell hergestellte Kultivierungs-Medien, die einen solchen Zusatz schon besitzen (z.

B. Panserin 701 der Firma PAN Biotech), bzw. Rezepte, sich ein solches Medium selber herzustellen (Shive *et al*, 1986). Diese speziellen Nährmedien werden aber in der Literatur nicht wirklich im Zusammenhang mit der Kultivierung von Lymphozyten erwähnt, sondern das für die Kultivierung von Leukozyten entwickelte RPMI-1640, dem dann das entsprechende Mitogen, sowie FCS in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt wird (Doyle *et al*, 1985). Auch mit Hilfe des von den Lymphozyten selbst gebildeten und sezernierten Wachstumsfaktor Interleukin-2 lassen sich die unterschiedlichen Lymphozyten-Subpopulationen zur Proliferation anregen (Schwartz, 1990), was man für die Zellkultur nutzen kann und eher dem natürlichen Aktivierungsweg entspricht, als der Einsatz von Mitogenen, weshalb diese Variante hier verwendet wurde. Im Hinblick darauf, dass die Kultivierung der equinen Lymphozyten über längere Dauer trotz diesem natürlichen Aktivierungsweg kompliziert war, da nach etwa 7 bis 10 Tagen die Lymphozyten oft abzusterben begannen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass noch Potential zur Verbesserung der Methode, aufbauend auf dieser Studie, besteht. Es könnte beispielsweise der zweite Teil des Aktivierungsweges, die Bindung eines spezifischen Antikörpers, um eine Grundaktivierung und die gesteigerte Expression des IL-2-Rezeptors zu initiieren, zusätzlich eingesetzt werden. Hierfür nutzt man dann meist das Mitogen an anderer Stelle (Doyle *et al*, 1985; Fong & Doyle, 1986). Ein weiterer Refinement-Punkt könnte der Einsatz von equinem IL-2 anstatt des humanen IL-2 darstellen. Denn das humane und das equine IL-2 unterscheiden sich an einigen Stellen doch deutlich voneinander, sodass die Aktivierung der Pferdelymphozyten unter rhIL-2 auf Grund einer niedrigeren Rezeptoraffinität oder Rezeptorbindung ineffizienter sein kann und somit eine Kultivierung über längere Zeit nicht optimal möglich ist. Es konnte schon gezeigt werden, dass equine Lymphozyten stärker auf equines rekombinantes IL-2 reagieren, als auf die humanen Varianten, jedoch mit keiner nennenswerten Signifikanz (Mealey *et al*, 2008). In verschiedenen Veröffentlichungen ist die Aktivierung von unter anderem auch equinen Lymphozyten mittels rhIL-2 beschrieben, doch in der Regel ist das in diesen Fällen nicht der einzige eingesetzte Aktivator. So beschreiben zwar verschiedene Autoren die Kultivierung equiner Lymphozyten mittels rhIL-2 (Doyle *et al*, 1985; Fong & Doyle, 1986; Mealey *et al*, 2008), jedoch nicht, ohne sie zuvor 3 Tage mit Hilfe von einem Mitogen (Concavalin A oder Phytohämagglutinin-P) schon in einen generellen, aktivierten Zustand gebracht zu haben. Eventuell ist das hier verwendete Protokoll durch eine dieser Methoden noch zu verbessern. Da es aber trotzdem möglich war eine ausreichende Anzahl von Lymphozyten über einen längeren Zeitraum zu aktivieren, sollte die hier verwendete Methode nicht verworfen, sondern gegebenenfalls auf ihr aufgebaut werden. Ob es überhaupt möglich ist, die Lymphozyten auf dem physiologischen Weg *in vitro* effizienter, als hier gezeigt über längere Dauer zu aktivieren, bleibt nach allen Literaturstudien trotzdem fraglich.

5.2.2 Zusammensetzung der PBMC-Mischkultur des Pferdes

Das Pferd besitzt ein granulozytäres Blutbild mit einem Verhältnis der Lymphozyten zu den Granulozyten von 40:60, wobei es rassebedingte Unterschiede gibt. Der physiologische Schwankungsbereich für die equinen Lymphozyten ist verhältnismäßig groß (20-45% des weißen Blutbildes) im Vergleich zu anderen Spezies, wie dem Hund (15-30% des weißen Blutbildes) (Dietz, 2006 Handbuch Pferdepraxis; Yin & Nolte, 2007). Die hier untersuchten PBMC-Mischkulturen stammten von einer Trakehner Stute und Konik-Ponys verschiedenen Geschlechts. Die Zusammensetzung der extrahierten Zellen an Tag 0 war bis auf einige Ausnahmen sehr konstant. In Tabelle 3 sind die Werte, die in der Literatur gefunden wurden, zusammengestellt und dienen als Vergleichswerte für die hier vorliegenden Ergebnisse. In einer Veröffentlichung von Ranera *et al* (2015) wurde die CD4+ und CD8+ Zusammensetzung kultivierter PBMCs untersucht. Diese wurden anders als für diese Arbeit nicht mit rhIL-2 inkubiert, sondern mit PHA. An Tag 3 lag der Anteil der CD4+-Zellen bei 40-58% und der CD8+ Zellen bei 16-20%, daher liegen die Werte im Bereich den auch wir ermitteln konnten (Tab. 21). Die Unterschiede können darauf beruhen, dass Ranera *et al* (2015) auch die doppelt positiven CD4+/CD8+-Zellen in der Population von 39% ermittelt haben, was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Autor	B-Zellen (%)	T-Zellen (%)	CD4+-Zellen (%)	CD8+-Zellen (%)	CD4+/CD8+-Zellen (%)
Viveiros et al, 1999	5,4	85,7	60,4	17,3	-
Fetsch et al, 2007	6 – 17,5	54,5 – 78,5	37,5 – 55,5	15 – 26,5	-
Ranera et al, 2015	-	-	33	11	39
De Mestre et al, 2010	-	-	54 – 56	16,5 – 17	-

Tabelle 22: Vergleichswerte für die Zusammensetzung der equinen PBMC-Kultur aus der Literatur: Tabellarische Zusammenfassung der in der Literatur gemachten Angaben zur Zusammensetzung von equinen Lymphozytenkulturen. Dabei waren nur zwei Arbeiten zu finden, die Studien in einem vergleichbaren Ausmaß, wie in dieser Arbeit geschehen, durchgeführt haben. Im weitesten stimmen die Ergebnisse mit denen in dieser Arbeit gefundenen Anfangspopulationen der Lymphozyten überein.

Genau wie in den verschiedenen Literaturstellen wurden die zu untersuchenden Zellen für diese Arbeit mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und via Durchflusszytometrie untersucht. Für die einzelnen Subpopulationen wurden andere Antikörper eingesetzt, was Ursache für unterschiedliche Ergebnisse sein kann. Für die T-Zell-Fraktion wurde beispielsweise von Viveiros *et al* (1999) ein CD3+Antikörper eingesetzt, im Gegensatz dazu wurde von Fetsch *et al* (2007) ein CD5+ Antikörper benutzt. Die hier ermittelten Anteile für B-Zellen, T-Zellen und die CD4+- und CD8+-Zellen liegen in einem, der Literatur vergleichbaren Bereich, wobei sich der Anteil an CD3+T-Zellen mit einem Mittelwert von 83% eher bei dem von Viveiros *et al* (1999) ansiedeln lässt. Der Anteil der B-Zellen an der Gesamtpopulation der PBMC-Mischkultur unterscheidet sich in den unteren Grenzen mit 3% geringfügig von den in 5-6% in der Literatur. Die niedrigen Werte stammen von den Konik-Ponys. Die Werte der Trakehner Stute entsprechen denen der Literatur von 5-17,5%. Es ist nicht bekannt, welcher Rasse die Tiere von Fetsch *et al* (2007) angehören, sodass rassebedingte Unterschiede für die B-Zellpopulation nicht analysiert werden konnten. Es ist bekannt, dass der Hämatokrit-Wert bei Ponys im Vergleich zu Großpferd etwas niedriger ausfallen kann (Dietz, 2006 Handbuch Pferdepraxis). Auch altersbedingte Veränderungen existieren. So sind z. B. die physiologischen Referenzbereiche einiger Blutparameter, wie der Lymphozyten oder Granulozyten, deutlich höher beim juvenilen gegenüber dem adulten Tier (Fey & Kolm, 2010 Fohlenmedizin). Für den Anteil der CD4+-Zellen ergibt sich hier ein Referenzbereich, der sich dem von Fetsch *et al* (2007), von 36 – 49%, annähert, wobei auch hier die niedrigeren Werte ausschließlich von den Konik-Ponys stammen. Was die These der unterschiedlichen Zusammensetzung des Blutes von Klein- und Großpferd stützen würde. Die ermittelten Werte von 16 – 20% für die CD8+-Population stimmen mit denen aus der Literatur überein. Es lassen sich keine Unterschiede zwischen Großpferd und Pony ausmachen. Auf Grund der geringen und dabei stark schwankenden Angaben zu der Zusammensetzung des lymphozytären Blutanteils des Pferdes sind die hier durchgeführten Analysen als gute Grundlage für ähnliche Versuchsreihen zu betrachten. Eine genauere Analyse der hier vermuteten Unterschiede zwischen Klein- und Großpferden sollte noch angestrebt werden.

5.2.3 FACS-Analyse der Lymphozyten-Mischkultur

Die Auswahl an Antikörpern für equine Blutzellen ist beschränkt. Vor allem wenn man die gesamte Bandbreite der equinen PBMCs analysieren möchte. Zudem sind die meisten kommerziell verfügbaren Antikörper, wie auch die hier verwendeten (3.6.1 Antikörper), in der Maus generiert. Das schränkt die potenzielle Kombination mit sekundären Antikörpern stark ein, sofern man verschiedene Populationen in einer Reaktion markieren will. Deshalb musste hier auf bestimmte Oberflächenmarker verzichtet werden, um anderen den Vorzug zu lassen. Studien in anderen Spezies, wie dem Menschen und verschiedenen Nagerspezies,

wie der Maus, haben bereits gezeigt, dass vor allem das membranverankerte CEACAM1 auf B-, sowie den T-Zellpopulationen und Granulozyten zu finden ist (Singer *et al*, 2002). Darüber hinaus wurde beim Menschen auch die Expression anderer membranverankerter CEACAMs hier nachgewiesen. Es handelt sich hierbei um die GPI-verankerten, humanspezifischen CEACAM6 und CEACAM8, die sowohl auf Granulozyten, als auch auf beiden Lymphozytenpopulationen zu finden waren (Skubitz *et al*, 1996; Singer *et al*, 2002). Deshalb lag die Vermutung nahe, dass vor allem diese Immunzellpopulationen für die Expression von Mitgliedern der equinen CEA-Genfamilie verantwortlich sein könnten. Da Granulozyten über die Dichtegradientenzentrifugation als eigenständige Population extrahiert werden können und bei der Aktivierung der Lymphozyten keine Rolle mehr spielen, konnte auf eine FACS-Analyse verzichtet werden. Somit wurde sich auf die Analyse der T-Zellpopulation hinsichtlich ihres Anteils an CD8-positiven oder CD4-positiven Zellen, sowie der B-Zellpopulation beschränkt. Auf andere Subpopulationen musste wegen fehlender kompatibler Antikörper verzichtet werden. Es existiert zwar ein anti-humaner Antikörper für den Oberflächenmarker CD14 von Monozyten und Makrophagen, der kreuzreaktiv für das Pferd ist (Moyo *et al*, 2013) und auch kommerziell bei Biometec, Greifswald erhältlich ist, jedoch im Zuge dieser Arbeit wenig Sinn gemacht hätte, da er nicht in Kombination mit den T-Zellmarkern eingesetzt werden konnte, da er des gleichen Zweitantikörpers bedarf und somit nicht in ein und derselben Färbung eingesetzt werden konnte. Ein weiterer, speziell für equine CD14-positive Zellen entwickelter Antikörper existiert zwar, wird aber nicht kommerziell vertrieben (Kabithe *et al*, 2010). Allerdings ist die Monozyten- und Makrophagenfraktion auch in anderen Spezies nicht dafür bekannt spezielle Mitglieder der CEA-Genfamilie zu exprimieren, vorrangig findet man dort CEACAM1 (Thompson *et al*, 1991; Singer *et al* 2002). Des Weiteren werden sie nicht mehr in der Kultur der aktivierten Lymphozyten erwartet. Auch ein NK-Zell-Marker für das Pferd wurde schon beschrieben und zwar für den Immunrezeptor NKp46, der unter den Säugetieren am weitesten verbreitete Oberflächenmarker für NK-Zellen (Noronha *et al*, 2012). Dieser ist aber bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht kommerziell erwerblich, weshalb hier darauf verzichtet wurde und somit nur auf die CD4- und CD8-Subpopulationen untersucht werden konnte. Resümierend kann man sagen, dass die wichtigsten PBMC-Fraktionen mit Hilfe der hier verwendeten Antikörper aber abgedeckt werden konnten und auch zu aufschlussreichen Ergebnissen geführt haben. Man kann natürlich darüber nachdenken, die beiden hier außen vor gelassenen Zellfraktionen (Monozyten und Makrophagen) in Zukunft zu diesen Ergebnissen zu ergänzen.

5.3 Auftreten der verschiedenen Spleißvarianten in der CEA-Genfamilie des Pferdes

Alternatives Spleißen ist bei Eukaryoten ein bekannter Mechanismus, um aus der prä-mRNA von einem Gen eine größere Anzahl funktioneller Proteine zu erhalten. Für den Menschen konnte nachgewiesen werden, dass etwa 35% aller vorhandenen Gene alternativem Spleißen unterliegen und somit die Diversität der Proteine erhöhen (Mironov *et al*, 1999). Auch für die CEA-Genfamilie konnten, nicht nur im Menschen, sondern auch in anderen Spezies, für einzelne Gene verschiedene Spleißvarianten nachgewiesen werden (CEA-Homepage). Die daraus resultierenden Proteine besitzen teilweise auch unterschiedliche Funktionen oder dienen einem Escape-Mechanismus für Pathogene. So exprimiert die Maus beispielsweise unterschiedliche Isoformen eines CEA-Mitglieds mit unterschiedlicher Affinität zum Maus-Hepatitis Coronavirus, womit Mäuse, die die eine Isoform exprimieren resistenter sind, als die anderen (Dveksler *et al*, 1993; Gray-Owen *et al*, 2006). Im Menschen gibt es das CEACAM3, was nahezu identisch mit CEACAM1 ist und von verschiedenen Pathogenen, die CEACAM1 zur Bindung an Zelloberflächen nutzen, deshalb mit höherer Affinität gebunden wird. Aber anders als bei CEACAM1, wird durch die Bindung an CEACAM3 ein oxidativer Burst ausgelöst und das Pathogen zerstört (Schmitter *et al*, 2004). Ausgehend von den Ergebnissen der anderen analysierten Spezies, konnte auch beim Pferd davon ausgegangen werden, dass einzelne Mitglieder der CEA-Genfamilie mehr als eine Spleißvariante besitzen.

5.3.1 Die equinen Spleißvarianten von CEACAM1

Wie erwartet, konnten wir im Pferd für das CEACAM1 verschiedene Spleißvarianten nachweisen, sowohl die zytoplasmatisch vollständige (CEACAM1-4L), als auch die verkürzte Version (CEACAM1-4S), die schon aus anderen Spezies bekannt waren (Beauchemin *et al*, 1999). Von diesen beiden Varianten gibt es auch extrazellulär, sowohl eine vollständige, als auch eine verkürzte Version, solches Spleißen ist neben dem Menschen auch schon in der Maus nachgewiesen wurden (Kammerer *et al*, 2001). Bis jetzt gibt es allerdings keine Hinweise auf die sezernierte Form, wie sie zum Beispiel beim Menschen, der Maus und der Ratte gefunden wurden (Budt *et al*, 2002, Terahara *et al*, 2009). Bisher wurden nur Gewebeproben von klinisch gesunden Pferden untersucht, fraglich ist, ob nicht einige Spleißformen von CEACAM1 oder anderer Mitglieder nur in tumorös entartetem Gewebe auftreten, wie es für CEACAM4 oder CEACAM5 beim Mensch gezeigt werden konnte (Wakabayashi-Nakao *et al*, 2014; Hatakeyama *et al*, 2013).

5.3.2 Spleißvarianten der membranverankerten equinen Mitglieder der CEA-Genfamilie

Auch für die anderen Mitglieder der CEA-Genfamilie des Pferdes, vor allem für die membrangebundenen Vertreter, wie das CEACAM45 und das CEACAM54, konnten im Pferd mehrere Spleißformen nachgewiesen werden. Vor allem das CEACAM54 tritt dabei nicht nur in unterschiedlichen membranverankerten Varianten in Erscheinung, sondern besitzt auch eine sezernierte Form, die relativ organspezifisch zu sein scheint. Auch bei anderen Spezies, vor allem dem Menschen, sind neben dem CEACAM1 auch alternative Spleißformen der anderen, exprimierten Mitglieder der CEA-Genfamilie bekannt, so zum Beispiel bei dem humanen CEACAM5 (Hatakeyama *et al*, 2013) oder das CEACAM4 (Wakabayashi-Nakao *et al*, 2014), für die jeweils zwei alternative Spleißvarianten gefunden wurden. Allerdings sind diese sowohl für das CEACAM5, als auch für das CEACAM4 bis jetzt ausschließlich in Tumorgewebe nachgewiesen worden, wo hingegen die Spleißvarianten von den equinen CEACAMs allesamt in gesundem Gewebe gefunden wurden. Des Weiteren ist zu sagen, dass das Auftreten einer sezernierten Spleißvariante eines an sich membranverankerten CEACAMs bis jetzt nur von CEACAM1 bekannt war (Kuroki *et al*, 1991; Budt *et al*, 2002). Diese lösliche Spleißvariante kann zu einer anderen Funktion des CEACAM1s führen, (Markel *et al*, 2004). Andere lösliche CEACAMs besitzen einen GPI-Anker, wie das CEACAM8, der bei Bedarf abgespalten werden kann, womit das Molekül von der Zellmembran gelöst agieren und seine Funktion ausüben kann (Singer *et al*, 2014).

5.3.3 Spleißvarianten der sezernierten equinen Mitglieder der CEA-Genfamilie

Neben den Spleißvarianten der membranverankerten CEACAMs, existieren im Pferd auch von den beschriebenen sezernierten Mitgliedern in Einzelfällen verschiedene Varianten. So zu sehen beim CEACAM41, dessen sezernierte Form an sich schon eine Spleißvariante im Vergleich zu der vorhergesagten Sequenz darstellt und in dieser Isoform sogar noch drei unterschiedliche Spleißvarianten besitzt. Bei zwei der Spleißvarianten des CEACAM41 ist es zu einen zu sogenannten Exon-Skipping der Transmembran-Domäne gekommen. Das heißt zum einen wurde die auf eine Spleißdonorseite folgende Spleißakzeptorseite übersprungen und zum anderen kam es noch vor der nächsten Spleißakzeptorseite zur Entstehung von alternativen 3'- Spleißstellen. Auch das sezernierte CEACAM46 gehört dazu, da es in aktivierten Lymphozyten eine zweite Spleißvariante besitzt, bei der die N-Domäne durch eine Intron-Retention verkürzt ist. Dass es zur Entstehung von neuen Spleißstellen im Intron kommen kann, wurde auch schon beim CEACAM5 des Menschen nachgewiesen (Hatakeyama *et al*, 2013). Im Gegensatz zu dem Spleißen im CEACAM46, welches ausschließlich die N-Domäne betrifft, befinden sich bei der sogenannten „Spleißvariante 3D“ des CEACAM5 die neue 5'-Spleißstelle und die neue 3'-Spleißstelle in unterschiedlichen Exonen, in Exon 3 und Exon 7, die dadurch beide verkürzt sind. Für diese Spleißvarianten ist aber nichts über ihre Funktion bekannt und auch bei der Version des CEACAM46 bleibt fraglich, ob es überhaupt funktionell ist. Das aus der „Spleißvariante 2“ des CEACAM46

resultierende Protein ist sehr kurz, da es nur aus der verkürzten N-Domäne besteht, allerdings ist die Erkennungssequenz zum Abspalten der Leader-Domäne („QLTVES“) erhalten geblieben. Um zu überprüfen, ob es sich bei dieser Spleißvariante um ein exprimierbares Protein handelt, wäre ein erster Schritt die Klonierung in einen Expressionsvektor, um so die Sekretion dieses Proteins zu überprüfen. Dass ein funktionelles Protein entstehen kann, konnte durch die Übersetzung der Basen-Sequenz in die Aminosäure-Sequenz gezeigt werden. Die Erkennungssequenz für das posttranslationale Abspalten der Leader-Domäne „QLTxES“ ist auch nach dem alternativen Spleißen intakt, das entstehende Protein wäre allerdings sehr kurz. Das CEACAM41 wird noch sehr viel komplexer gespleißt, nicht nur, dass die Transmembran-Domäne aus der pre mRNA entfernt wird, es existiert neben der vorhergesagten, auch eine alternative 3'-Spleiß-Akzeptorstelle, die sich mitten im Intron von Transmembran-Domäne und erster zytoplasmatischer Domäne befindet. Der Grund dafür ist ungeklärt, auch ist ein solches Spleißen von den Mitgliedern der CEA-Genfamilie bis jetzt nur in Spleißformen aus Tumorgewebe bekannt, wie im Fall des CEACAM4-sv1 (Wakabayashi-Nakao *et al*, 2014). Fälle in denen ein membranverankertes CEACAM auch eine sezernierte Isoform besitzt, sind in gesundem Gewebe alles Fälle von Exon-Skipping. Vor allem für CEACAM1 im Menschen, Ratten und Mäusen wurden sogar mehrere sezernierte Formen des Gens nachgewiesen (Kuroki *et al*, 1991; Budt *et al*, 2002; Terahara *et al*, 2009).

Schlussendlich lässt sich sagen, dass beim Pferd auf Grund des alternativen Spleißens eine starke Diversität der exprimierten CEA-Genfamilienmitglieder vorliegt. Man findet auch in gesundem Gewebe neben Isoformen des CEACAM1 verschiedene Isoformen von sowohl membranverankerten, als auch sezernierten Mitgliedern der equinen CEA-Genfamilie. Ob alle tatsächlich exprimiert werden oder nur in Form von mRNA existieren, bleibt noch zu klären. Darüber hinaus muss auch geklärt werden, welche Funktion sie innehaben. Denn für die verschiedenen Isoformen von CEACAM1 wurden in den anderen Spezies auch schon sehr unterschiedliche Funktionen, vor allem die Immunzellen betreffend, nachgewiesen (Markel *et al*, 2004; Gray-Owen, 2006). Des Weiteren bleibt zu klären, ob es nicht noch mehr Isoformen der einzelnen Mitglieder, beispielsweise in tumorös entartetem Gewebe gibt, wie es ja zum Beispiel für das CEACAM5 im Menschen gezeigt werden konnte (Hatakeyama *et al*, 2013).

5.4 Konservierte Mitglieder der CEA-Genfamilie

Von den konservierten Mitgliedern, die bis jetzt in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden konnten und erstmals in der Maus entdeckt wurden CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19 und CEACAM20 (Zebhauser *et al*, 2005), konnten beim Pferd nach Genom-Analysen nur Hinweise auf zwei dieser vier Gene gefunden werden.

5.4.1 Die Spleißvariante und das Expressionsmuster von CEACAM19

Das CEACAM19 konnte in Geweben nachgewiesen werden, die auch schon von der Maus als Expressionsort dieses Gens bekannt waren, der Zunge und dem Oesophagus, Gewebe mit squamösem Epithel (Zebhauser *et al*, 2005). Auch beim Menschen ist dieses Gen in verschiedenen Geweben zu finden, die sich klar von dem Expressionsmuster der Maus unterscheiden (Scorilas *et al*, 2003). Nicht alle beim Menschen getesteten Gewebe standen hier für das Pferd zur Verfügung. Manche Proben, wie Prostata, Nebenniere und fötales Gehirn fehlen im Gewebespektrum noch. Doch ein Großteil der beim Menschen für CEACAM19 positiven Gewebe, wie Niere, Euter, Uterus, Dünndarm und Skelettmuskel standen auch für das Pferd zur Beprobung zur Verfügung und waren allesamt negativ für das Gen. Dieses Ergebnis belegt, dass das CEACAM19 Expressionsmuster vom Pferd eher dem von Nagetieren zu entsprechen scheint. Bei der Sequenzierung von CEACAM19 konnte dann im Rahmen dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass von den 3 Spleißvarianten, die auf ensembl.org oder ncbi.nlm.nih.gov zu finden sind, nur eine wirklich exprimiert wird. Allerdings fehlen noch einige Organproben, die im Menschen als positiv für CEACAM19 gefunden wurden. Auch konnten im Menschen zwei verschiedene Spleißvariationen nachgewiesen

werden, die jedoch in den meisten dort positiven Geweben auftauchten (Scorilas *et al*, 2003). Auch für das Pferd kann das Auftreten weiterer Spleißvarianten von CEACAM19 in anderen Geweben nicht ausgeschlossen werden. Allerdings war in allen hier getesteten Geweben immer nur eine Bande mit dem gleichen Sequenzierungsergebnis nachzuweisen.

5.4.2 Die Expression von CEACAM16

Ein weiteres Mitglied der konservierten CEA-Gene, das beim Pferd beruhend auf Genomanalysen auftreten soll, ist das CEACAM16. Dieses wurde in anderen Spezies bis jetzt nur spezifisch im Innenohr, speziell der Tektorialmembran, nachgewiesen (Zheng *et al*, 2011; Kammerer *et al*, 2012). Bei der Maus konnte es auch sehr exklusiv im Cerebellum nachgewiesen werden, was von den anderen Spezies noch nicht bekannt war (Zebhauser *et al*, 2005). Es stellt ein stark konserviertes Mitglied der CEA-Genfamilie in den Säugetieren dar, mit Orthologen bis hin zum Schnabeltier, in dem neben CEACAM16 kein weiteres Mitglied der CEA-Genfamilie nachgewiesen werden konnte (Kammerer, R. & Zimmermann, W., 2010). Unter der Untergruppe dieser stark konservierten Mitglieder der CEA-Genfamilie stellt CEACAM16 auch eine Sonderform dar, da es das einzige sezernierbare Gen dieser Gruppe zu sein scheint (Kammerer *et al*, 2012). Es besitzt eine Struktur, die am ehesten an murine PSGs erinnert, mit mehreren N-Domänen (Kammerer & Zimmermann, 2010). Der Nachweis dieses Gens konnte im Rahmen dieser Arbeit nur genomisch erfolgen. Da zwar eine Probe des Innenohres vorlag, allerdings keine Möglichkeit bestand aus diesem die Tektorialmembran oder auch nur die Cochlea zu isolieren. Bei allen größeren Säugetieren dürfte das ein Problem darstellen, da die knöchernen Struktur, welche das Innenohr beinhaltet, sehr stabil und hart ist, was eine Isolation der RNA für weitere Analysen nahezu unmöglich macht. Eine Möglichkeit wäre die Analyse vom Innenohrmaterial junger Tiere oder sogar Embryos, wo der Knochen noch nicht so stark ausgehärtet ist. Interessant wäre zudem, ob auch im Cerebellum vom Pferd mRNA von CEACAM16 nachgewiesen werden kann. Dieser Verdacht liegt nahe, da ja schon für das konservierte CEACAM19 ein Expressionsmuster nachgewiesen werden konnte, welches dem der Maus sehr ähnlich ist. Doch auch Proben vom Gehirn standen für diese Arbeit nicht zur Verfügung und müssen im weiteren Verlauf überprüft werden. Wenn der Nachweis im Innenohr gelingt, wäre darüber hinaus auch interessant, ob es beim Pferd zu Mutationen kommt, die das Hören beeinträchtigen können, wie es beim Menschen oder der Maus gezeigt werden konnte (Zheng *et al*, 2011, Kammerer *et al*, 2012), und ob es auch einen hereditären Hintergrund gibt, wie es bei einer chinesischen Familie als autosomal dominanter Vererbungsprozess der Fall war (Wang *et al*, 2015).

5.5 Mitglieder der CEA-Genfamilie, die beim Pferd nur genomisch nachgewiesen wurden

Wie schon zuvor erwähnt, werden einige CEACAMs bzw. Spleißvarianten bestimmter CEACAMs sehr exklusiv in bestimmten Geweben oder nur in bestimmten Situationen, wie der tumorösen Entartung des Gewebes (Hatakeyama *et al*, 2013) oder von der Plazenta (CEACAM49) oder von aktivierten Lymphozyten (CEACAM41) exprimiert. Da bis jetzt noch nicht alle Gewebe vom Pferd analysiert werden konnten, kann eine solche Expression für die noch fehlenden Mitglieder nicht ausgeschlossen werden.

5.5.1 Equine, sezernierbare Mitglieder der CEA-Genfamilie, die genomisch bestätigt wurden

Auch andere Mitglieder der equinen CEA-Genfamilie konnten bis jetzt nur genomisch nachgewiesen werden, obwohl ein breites Spektrum an Gewebeproben untersucht wurde. Auch für diese Mitglieder könnte es einen sehr spezifischen Expressionsort geben, der in dieser Studie nicht identifiziert werden konnte. Wie es auch bei dem CEACAM2 der Maus der Fall ist, welches neben Niere und Darm, hauptsächlich im Hoden exprimiert wird (Nédellec *et al*, 1994; Han *et al*, 2001). Es besitzt noch eine Isoform, das CEACAM2-L, welches exklusiv im Hoden im Epithel der Tubuli seminiferi nachgewiesen wurde

(Salaheldeen *et al*, 2012), oder aber sie werden in einem Gewebe, wie der Plazenta nur zu ganz speziellen Zeitpunkten exprimiert. Dass sich das PSG-Expressionsmuster über die Schwangerschaft hin ändert, konnte schon für die Maus gezeigt werden. Bei ihr konnte nachgewiesen werden, dass die Expression eines großen Teils der PSGs zu Beginn der Trächtigkeit schwach ist und mit fortschreitender Tragezeit zunimmt. Für einen anderen Teil traf genau das Gegenteil zu (Mc Lellan *et al*, 2005). Andere Mitglieder der murinen PSGs, wie zum Beispiel das CEACAM10 und das CEACAM11, werden sogar nur zu ganz bestimmten Zeitpunkten exprimiert. CEACAM11 wird exklusiv von der murinen Plazenta exprimiert und zwar nicht vor Tag 12,5 nach Koitus (Kataoka *et al*, 2000), wohingegen das CEACAM10 zwar nicht exklusiv von der Plazenta der Maus exprimiert wird, dafür aber dort nur in der sehr frühen Phase zwischen Tag 6,5 und 10,5 (Finkenzeller *et al*, 2003). Eine solche Expression wäre auch für die hier nur genomisch nachgewiesenen CEACAM44, CEACAM52 und CEACAM56 im Pferd denkbar. Schon für die Lymphozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass bestimmte Mitglieder der equinen CEA-Familie, wie das CEACAM41 oder auch das CEACAM55 nur in einem bestimmten Zeitraum exprimiert werden. Die Proben der Endometrial Cups waren von einem Tier und nur zu einem Zeitpunkt entnommen. Da die Endometrial Cups aber über einen längeren Zeitraum als Teil der equinen Plazenta existieren, von Tag 35 bis etwa Tag 100, wäre es denkbar, dass sich in diesem Zeitraum auch ihr Expressionsmuster ändert. Auch andere Anteile der Plazenta wären als Expressionsort denkbar. Die fehlenden CEACAMs gehören alle zu der sezernierten PSG-Untergruppe des Pferdes und wären somit ideale Kandidaten für eine solche Expression.

5.6 Unterschiede zu bereits vorliegenden Ergebnissen für die Expression von equinen CEACAMs

Für das Expressionsmuster der membranverankerten Mitglieder der CEA-Genfamilie konnten im Zuge dieser Arbeit einige, wenn auch feine, Unterschiede zu den vorangegangenen Studien von Denis Aleksic, 2010 festgestellt werden. Zum einen in Bezug auf das CEACAM45, für das eine gesteigerte Expression mit zunehmender Aktivierungsdauer der Lymphozytenkultur erwartet wurde. Hier konnte jedoch eher das Gegenteil festgestellt werden, mit der stärksten Expression dieses Gens an Tag 0, direkt nach der Isolierung der Zellen. Auf Grund der Tatsache, dass CEACAM45 nicht auf den T-Zellen zu finden ist und die Zusammensetzung der Kultur hier, anders als 2010, genau bekannt ist, könnte das auf eine Expression auf den B-Zellen hindeuten. Auch für das CEACAM1 konnten andere Expressionszeiten ermittelt werden. Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen (Aleksic, D. 2010), bei denen nur an Tag sieben dieses Gen nachgewiesen werden konnte (Abb.38), wurde mit einer starken Expression von CEACAM1 auf den frisch isolierten Lymphozyten nicht gerechnet. Von der damals untersuchten Mischkultur ist, wie gesagt, die Zusammensetzung allerdings nicht bekannt. Was bekannt ist, ist die Expression von CEACAM1 auf B-Lymphozyten, die für ihre Aktivierung eine Rolle spielt (Greicius *et al*, 2003) und die an Tag 0 der Isolierung noch zahlreich in der Kultur vorhanden sind und vermutlich für die Expression zu diesem Zeitpunkt mitverantwortlich sind. Danach übernehmen zunehmend die Lymphozyten die Expression, denn die B-Lymphozyten sind nach einer Woche Aktivierung fast vollständig aus der Kultur verschwunden (Abb.38).

5.7 Die Expression der nachgewiesenen löslichen CEACAMs (PSGs) im Pferd

Die Untergruppe der schwangerschafts-spezifischen Glykoproteine wurde bisher beim Menschen (Lei *et al*, 1992), bei der Maus (Kromer *et al* 1996), der Ratte (Rebstock *et al* 1993) oder auch dem Pavian (Zhou & Hammarström, 2001) untersucht. In jeder dieser Spezies war die Expression dieser Gene zu großen Teilen von der Plazenta oder von dem embryonalen Gewebe ausgegangen. Darüber hinaus ist allen Spezies gemein, dass sie eine hämochochoreale Plazenta ausbilden.

5.7.1 Expressionsmuster der Endometrial Cups

Das Pferd besitzt statt einer hämochorialen Plazenta nur die Endometrial Cups. Durch sie wird zeitweise ein Kontakt von fetalem Gewebe und maternalem Immunsystem gewährleistet, der dem der hämochorialen Plazenta ähnlich ist. Darüber hinaus existieren sezernierte Mitglieder der CEA-Genfamilie im Pferd. Diese Fakten legen die Vermutung nahe, dass diese sezernierten Mitglieder der CEA-Genfamilie auch der Gruppe der PSGs angehören und von der equinen Plazenta exprimiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeichnen jedoch ein anderes Bild, da ein Großteil der sezernierten CEACAMs nicht, wie erwartet, von den Endometrial Cups exprimiert werden, sondern von den Zellen des Immunsystems selbst, den Granulozyten und den Lymphozyten. Eine solche Bandbreite von verschiedenen, sezernierten Mitgliedern der CEA-Genfamilie ist bis jetzt einzigartig und wirft die Frage auf, ob man bei diesen equinen CEACAMs überhaupt noch von PSGs sprechen kann. Auf Grund ihres zum Teil mit den PSGs identischen Expressionsortes wollen wir ihnen jedoch eine gewisse Verwandtschaft nicht absprechen und bezeichnen sie deshalb als PSG-ähnliche CEACAMs (Aleksic *et al*, 2016). Ein Teil dieser Untergruppe, CEACAM48, CEACAM49 und CEACAM55, konnte auch bereits in vorangegangenen Studien (Aleksic *et al*, 2016) als von den Endometrial Cups exprimiert, gezeigt werden. Die identische Anzahl wurde im Rahmen dieser Arbeit aber auch auf aktivierten Lymphozyten nachgewiesen, CEACAM41, CEACAM46 und CEACAM55. Ein ebenso großer Anteil sezernierter CEACAMs des Pferdes wurde bis jetzt aber auch nur genomisch nachgewiesen, CEACAM44, CEACAM52 und CEACAM56. Diese drei Vertreter könnten durchaus zu anderen Zeitpunkten von der equinen Plazenta exprimiert werden, denn die hier untersuchte Probe war von einem Einzeltier zu einem spezifischen Zeitpunkt entnommen. Für genauere Aussagen müssten noch weitere Tiere zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Endometrial Cups untersucht werden. Für CEACAM44 konnte beispielsweise eine solche Theorie im Anschluss an diese Arbeit bereits bestätigt werden, da es im Choriongürtel zu spezifischen Zeitpunkten nachgewiesen werden konnte (Aleksic, D. *et al*, 2016). Und auch für die anderen beiden potentiell sezernierbaren CEACAMs, die im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurden, wäre so etwas denkbar. Denn wie schon erwähnt, konnte bei anderen Spezies, wie der Maus, bereits gezeigt werden, dass die PSGs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Trächtigkeit auftreten (Kataoka *et al*, 2000; Finkenzeller *et al*, 2003). Da die Trächtigkeit der Maus mit etwa drei Wochen deutlich kürzer ist, als die des Pferdes mit 11 Monaten und die Endometrial Cups über etwa 70 Tage dieser Trächtigkeit existieren, ist es durchaus denkbar, dass sich ihr Expressionsmuster ändert. Auch ihr Verhalten ändert sich von invasiven Trophoblastenzellen zu eCG-sezernierenden Cups bis hin zu dem Zeitpunkt, wo diese Sekretion eingestellt wird und sie von den maternalen Immunzellen abgeräumt werden (Noronha *et al*, 2010). Zu diesen Zeitpunkten wäre ein unterschiedliches Expressionsmuster durchaus denkbar, in dem auch die bis jetzt nur genomisch nachgewiesenen CEACAMs eine Rolle spielen. Es ist also noch nicht genau zu sagen, ob nicht auch beim Pferd, wie in den anderen Spezies, nicht doch der Großteil der sezernierten Mitglieder der CEA-Genfamilie von der Plazenta exprimiert wird. Weitere Untersuchungen in diesem Bereich sind durchaus angebracht.

5.7.2 Expression auf Immunzellen

Es musste im Rahmen dieser Arbeit allerdings festgestellt werden, dass auch ein bedeutender Anteil der sezernierten CEACAMs von Zellen des Immunsystems exprimiert wird, was in anderen Spezies bis jetzt nicht nachgewiesen werden konnte. Dieser Umstand stärkt nur die Theorie, dass das maternale Immunsystem auch durch Einwirkung der PSGs den semiallogenen Fetus nicht abstößt und somit eine Aufrechterhaltung der Trächtigkeit ermöglicht wird. Schon für andere Mitglieder der CEA-Genfamilie konnten vor allem im Menschen homophile (Markel *et al*, 2002) und heterophile (Singer *et al*, 2014) Interaktionen nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von PSGs in den Endometrial Cups der Plazenta und auf Lymphozyten zu verschiedenen Aktivierungszeitpunkten könnte für genau solche Interaktion sprechen. Die Wechselwirkung von PSGs mit Zellen des Immunsystems konnte

schon mehrfach bei anderen Spezies gezeigt werden. So in der Maus im Falle des PSG18, welches von der murinen Plazenta exprimiert wird und die Expression von IL-10 in murinen Makrophagen induziert, was als mögliche Wechselwirkung zwischen Immunsystem und Plazenta für den Fortbestand einer erfolgreichen Trächtigkeit erachtet wird (Wessells *et al*, 2000). Eine Veränderung der Lymphozyten in der Umgebung der Endometrial Cups im Gegensatz zu dem peripheren Blut konnte im Pferd bereits gezeigt werden. Dort wurde nachgewiesen, dass in der unmittelbaren Umgebung der Cups weniger IL-4 exprimierende Lymphozyten, dafür aber eine größere Anzahl von Interferon γ positiven und FOXP3-positiven Lymphozyten vorherrschten (De Mestre *et al*, 2010). Auch ein solcher Zustand könnte durchaus durch die Interaktion von den sezernierten PSGs im Pferd vermittelt werden, die hier sowohl auf den Lymphozyten, als auch auf den Endometrial Cups nachgewiesen werden konnten.

5.8 Funktionen der sezernierten, equinen CEACAMs über die feto-maternale Kommunikation hinaus

Wie schon erwähnt wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zuvor von anderen Spezies nicht bekanntes Spektrum von vorrangig sezernierbaren Mitglieder der CEA-Genfamilie, welche von Zellen des Immunsystems exprimiert werden, nachgewiesen. Da die untersuchten Lymphozyten sowohl von männlichen, als auch weiblichen Tieren stammten und die Aktivierung unspezifisch erfolgte, aber trotzdem eine Expression besagter Gene stattfand, bleibt die Frage, ob diese Mitglieder der equinen CEA-Genfamilie über die Grenzen der feto-maternalen Kommunikation hinaus eine Bedeutung für die Interaktionen im Immunsystem und speziell die Informationsweiterleitung zwischen Immunzellen besitzen. Einen ersten Beweis für eine solche mögliche Bedeutung bietet der Stammvater dieser Genfamilie das CEACAM1, das vor allem in Maus und Mensch schon eingehend untersucht wurde und dessen Expression auf Immunzellen, wie den B- und T-Lymphozyten, sowie Makrophagen verschiedener Spezies bekannt ist (Singer *et al*, 2002; Kuespert *et al*, 2006). Hier übt es unter anderem Funktionen im Aktivierungsprozess der B- oder T-Lymphozyten aus (Greicius *et al*, 2003; Kammerer *et al*, 2001). Ein anderer Vertreter dieser Genfamilie mit immunologischer Funktion in Form eines Phagozytose-auslösenden Rezeptors ist das CEACAM3, welches auf humanen Granulozyten zu finden ist (Pils *et al*, 2008; Buntru *et al* 2010). Für das CEACAM1 ist darüber hinaus bekannt, dass es sowohl homophile Bindungen zu sich selbst (Wikström *et al*, 1996), als auch heterophile Bindungen zu anderen Mitgliedern der CEA-Genfamilie eingehen kann und darüber, wie im Fall des CEACAM5, auch eine immunmodulatorische Funktion ausübt (Stern *et al*, 2005). Mit diesem Hintergrundwissen ist es durchaus denkbar, dass auch die sezernierbaren Mitglieder der equinen CEA-Genfamilie eine solche Funktion ausüben und über homophile, wie auch vor allem heterophile Bindungen mit membranverankerten, signalmotiv-tragenden CEACAMs zur Signaltransduktion im Immunsystem beitragen (Abb. 40). Es wäre beispielsweise denkbar, dass ein zum früheren Aktivierungszeitpunkt exprimiertes CEACAM41 zusätzliche Immunzellen zu dem Infektionsort leitet, wohingegen ein zum späteren Zeitpunkt der Lymphozytenaktivierung exprimiertes CEACAM46 durch Bindung an die membranverankerten und auf Immunzellen des Pferdes zu findenden CEACAM1 und CEACAM43 über ihr inhibierendes Signalmotiv eine überschwängliche Reaktion des Immunsystems verhindert.

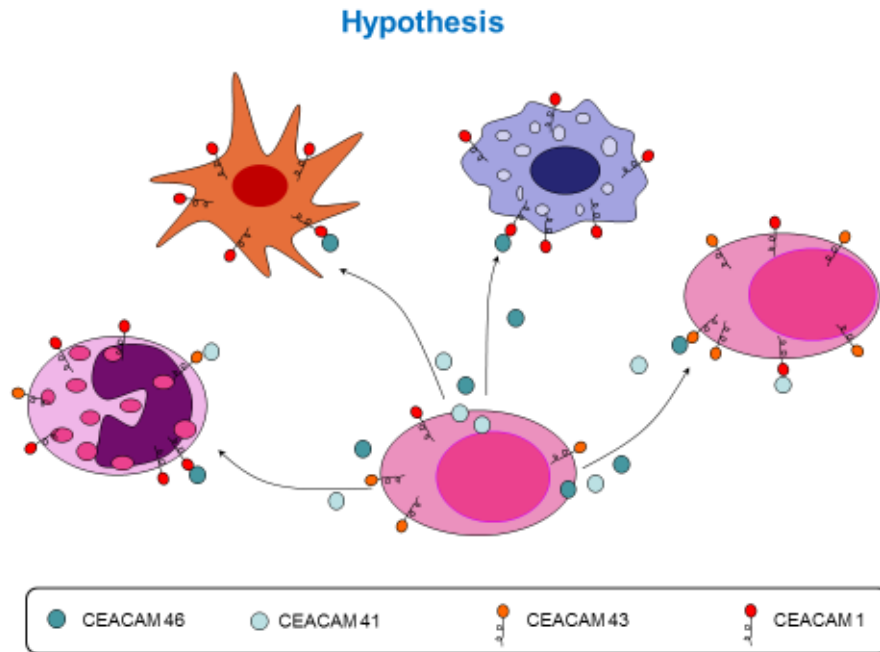


Abb. 40: Mögliche Funktion der sezernierten Mitglieder der CEA-Genfamilie im Immunsystem

Die von den aktivierten Lymphozyten exprimierte CEACAM41 und CEACAM46, hier in hellen und dunklen Blautönen dargestellt, könnten über kürzere oder längere Distanzen an die membranverankerten Mitglieder der CEA-Genfamilie auf Immunzellen, den in rot und orange dargestellten CEACAM1 und CEACAM43, über deren inhibierende Signalmotive eine Überreaktion des Immunsystems verhindern.

Eine solche Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr überprüft werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

5.9 Lösliche CEACAM-Mitglieder, die sowohl bei den Endometrial Cups, als auch bei der PBMC-Mischkultur nachgewiesen wurden – Hinweis auf eine lymphozytäre Verunreinigung der Gewebeproben?

Wie in Abb. 29 und Abb. 37 gezeigt werden konnte, werden ein Teil der potentiellen PSGs von den Endometrial Cups exprimiert. Ein anderer Teil wird jedoch von den Lymphozyten exprimiert und erscheint nicht in den Endometrial Cups. Mit einer Ausnahme, dem CEACAM55, welches sowohl auf den Endometrial Cups, als auch auf den aktivierten Lymphozyten nachzuweisen ist. Wie schon in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte, werden die Endometrial Cups von Leukozyten, vorrangig CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, umgeben (Grüning *et al*, 1995), das bedeutet, dass bei einer Probenahme dieses Gewebes durchaus die Möglichkeit besteht, auch Teile der Leukozyten zu extrahieren. Die in der Probe enthaltene Leukozyten-RNA könnte dann wiederum zu falsch-positiven Ergebnissen in den Expressionsstudien führen. Die PBMC-Mixkultur hingegen ist aus Blutproben gewonnen und mit keinerlei Gewebe kontaminiert, die in den dort durchgeführten Expressionsstudien gewonnenen Ergebnisse sind somit repräsentativ. Mitglieder der CEA-Genfamilie, die in beiden Proben nachgewiesen wurden, wie hier das CEACAM55, können eindeutig der Expression von den Leukozyten zugeordnet werden. Der Nachweis auf den Endometrial Cups ist jedoch zweifelhaft, auf Grund der möglichen Verunreinigung der Probe mit Leukozyten. In anderen Spezies, wie der Maus konnte aber bereits nachgewiesen werden, dass von der Plazenta exprimierte Mitglieder der CEA-Genfamilie nicht ausschließlich dort nachgewiesen werden, sondern durchaus auch in anderen Geweben auftauchen können. Ein Beispiel dafür ist das murine CEACAM10 (Finkenzeller *et al*, 2003) welches zu einem frühen Zeitpunkt der Plazentation bei der Maus nachgewiesen werden kann, darüber hinaus aber in der adulten Maus auch in den unterschiedlichsten Geweben,

wie der Blase, dem Knochenmark und verschiedenen Darmabschnitten (Zebhauser, 2006) nachgewiesen werden konnte. Auch beim Pferd war es möglich, die von der Plazenta exprimierte Mitglieder der CEA-Genfamilie auch noch in anderen Geweben nachzuweisen (Abb. 29). Es ist durchaus möglich, dass auch das CEACAM55 in mehr Geweben als nur den Endometrial Cups exprimiert wird. Ein weiterer Fakt, der dafür spricht, ist die Tatsache, dass neben dem CEACAM55 kein weiteres Endometrial Cup assoziiertes, sezerniertes CEACAM auf den Lymphozyten nachgewiesen werden konnte. Andersherum konnte auch keines der von den Lymphozyten exprimierten und sezernierten CEACAMs auf den Proben der Endometrial Cups nachgewiesen werden. Bei einer Verunreinigung würde man so etwas durchaus erwarten. Um diesen Sachverhalt jedoch sicher ausschließen zu können, wären weitere Proben der Endometrial Cups nötig, um deren Expressionsmuster mit dem hier vorliegenden zu vergleichen. Darüber hinaus wäre vielleicht die immunhistochemische Untersuchung des Endometrial Cup Gewebes auf das Vorhandensein von Lymphozyten vor Extraktion der RNA empfehlenswert, um sicher ausschließen zu können, dass keine Verunreinigung vorliegt.

5.10 Verlust der durch Genomanalysen vorhergesagten inhibitorischen oder aktivierenden Signalmotive (ITIM/ITAM) beim Pferd

Eine wichtige Funktion von Mitgliedern der Ig-Superfamilie ist die Übertragung eines Signals über einen Liganden in eine Zelle um in dieser schlussendlich eine Funktion zu aktivieren oder zu inhibieren. Bei den meisten Rezeptoren, wie auch den B- und T-Zell-Rezeptoren werden dafür akzessorische Proteine benötigt, wie DAP12 oder CD3, um das Signal in die jeweilige Zelle weiterzuleiten (Janeway Immunologie, 2014; Humphrey *et al*, 2005). Die Mitglieder der CEA-Genfamilie können in der membranverankerten Form auf dem langen zytoplasmatischen Bereich bereits ein eigenes Signalmotiv in Form eines ITIM oder ITAM tragen, was die Existenz von akzessorischen Proteinen überflüssig macht (Barrow *et al*, 2008). Auch im Pferd finden sich auf einer Reihe der membranverankerten CEACAMs auf RNA-Ebene solche Signalmotive, hauptsächlich in Form des inhibierenden Motivs. Nach der vollständigen Sequenzierung aller nachgewiesenen Mitglieder, lässt sich jedoch feststellen, dass diese Signalmotive bei der Entstehung des Proteins nicht berücksichtigt werden, da in den meisten Fällen ein Stopp-Codon innerhalb oder am Ende der Transmembran-Domäne zu finden ist (Abb.14). Nur im Falle der konservierten Mitglieder, des CEACAM1 und CEACAM19, sowie dem CEACAM43 bleiben diese Signalmotive erhalten (Abb.13; Abb.14). Im Fall des einzigen ITAM-tragenden Gens in dieser Familie beim Pferd, dem CEACAM41, ist das potentielle Protein nicht länger membranverankert und kann als lösliche Variante auf anderem Weg an der Signalkaskade teilhaben. Sämtliche ITIM-tragenden Gene bleiben jedoch membranverankert und bedürfen nun eines akzessorischen Moleküls für die Signaltransduktion. Die Gründe, warum es beim Pferd zu diesem massiven Rückgang der Signalmotive kommt, sind nicht bekannt. Es ist jedoch zu sagen, dass die entsprechenden zytoplasmatischen Exone auf mRNA-Ebene bei fast jedem dieser Gene noch nachgewiesen werden konnten, sodass durch einen SNP innerhalb des Stopp-Codons durchaus wieder die Ausbildung dieser Signalmotive möglich wäre (Abb.14).

6 Zusammenfassung

Die Analyse der karzinoembryonalen Antigen- und schwangerschaftsspezifischen Glykoprotein-Genfamilie des Pferdes

Eine wohlgeordnete Immunreaktion verlangt eine Koordination zwischen den einzelnen Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, was neben den sezernierten Molekülen, wie den Zytokinen und Chemokinen, über Oberflächenmoleküle der verschiedenen Rezeptorfamilien vor allem auch aus dem Bereich des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes vermittelt wird. Neben den weitreichend bekannten und analysierten Familien, wie der KIR- oder der LIR-Familie, zählt dazu auch die CEA-Genfamilie. Diese befindet sich im erweiterten Bereich des LRCs und ist bei verschiedenen Säugerspezies bereits in mehr oder weniger großem Umfang nachgewiesen. Auch im Genom des Pferdes konnten Hinweise auf Mitglieder dieser Genfamilie gefunden und später auch experimentell ihr Vorhandensein bestätigt werden. Während bei anderen Spezies, wie dem Menschen oder den Nagerspezies Maus und Ratte, die Ausdehnung dieser Familie schon eingehend untersucht wurden, ist über diese beim Pferd noch nicht allzu viel bekannt. Aus Genomanalysen, die zum Teil im Rahmen einer Bachelorarbeit (Aleksic, 2010) bestätigt wurden, lässt sich vermuten, dass diese Genfamilie auch beim Pferd relativ viele Mitglieder umfasst, unter denen sich auch sezernierte Mitglieder befinden. Solche sezernierten Mitglieder werden auch als PSGs bezeichnet und sind bislang nur von Spezies mit einer hämochorialen Plazenta bekannt, wo auch in den meisten Fällen ihr Expressionsort liegt. Das Pferd hingegen bildet eine epitheliochoriale Plazenta aus, bei der der feto-maternale Kontakt nur marginal besteht, bis auf den Bereich der Endometrial Cups, wo sich eine, der hämochorialen Plazenta nicht unähnliche Situation finden lässt. Diese Mitglieder wurden bereits von der AG Kammerer (Aleksic *et al*, 2016) genauer untersucht, weshalb im Rahmen dieser Arbeit spezielles Augenmerk auf membranverankerte Mitglieder gelegt wurde.

Eine weitere Besonderheit der CEA-Genfamilie ist die Ausbildung von Signalmotiven in Form eines ITIM- oder ITAM-Motivs. Auch bei den membranverankerten Mitgliedern der equinen CEA-Familie lassen sich Hinweise auf die Ausprägung solcher Rezeptormotive finden. Von den zwei ITIM-haltigen Rezeptoren CEACAM1 und CEACAM43 konnte die Expression in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, wobei Spleißvarianten entdeckt wurden, die bereits von der Maus bekannt waren. Die restlichen equinen Mitglieder der CEA-Genfamilie, die nach Genomanalysen ein ITIM oder ITAM im zytoplasmatischen Anteil tragen sollten, haben dieses Signalmotiv allem Anschein nach verloren. Bei keinem dieser CEACAMs konnte nach Sequenzanalysen noch ein Signalmotiv im exprimierten Gen nachgewiesen werden.

Dafür konnten außergewöhnliche Motive, wie eine spezielle, repetitive Sequenz im extrazellulären Anteil des CEACAM54 als tatsächlich im fertigen Gen vorhandene Sequenz bestätigt werden. In ersten Expressionsstudien über die Generierung von Fusionsproteinen konnte nachgewiesen werden, dass diese speziellen Gene tatsächlich exprimierbar sind.

Der einzige equine CEA-Vertreter mit einem vorhergesagten ITAM-Motiv, das CEACAM41, hat dieses nach den hier gefundenen Ergebnissen verloren. Die einzigen nachweisbaren exprimierten Spleißvarianten deuten auf Grund des Fehlens der Transmembrandomäne auf ein lösliches Molekül hin. In anderen Spezies, wie dem Hund, in denen ITAM-Motive in der CEACAMs nachgewiesen wurden, blieben diese erhalten und wurden im Gegensatz zum Pferd sogar eher dupliziert.

Anders als von anderen Spezies bekannt, ist das Expressionsmuster der sezernierten PSG-ähnlichen CEACAMs, nicht auf die Plazenta beschränkt, sondern weist im Gegenteil eine erhöhte Expression auf den Immunzellen, speziell den aktivierten T-Lymphozyten auf. Die immunologische Bedeutung dieser löslichen CEACAMs im Pferd wird noch durch die Tatsache unterstrichen, dass einige lösliche Mitglieder nur auf bestimmten Lymphozytenklassen exprimiert werden, wie das CEACAM55, dass auf den CD4-positiven

T-Zellen spezifisch nachgewiesen werden kann. Diese Subklasse stellt auch die T-Helferzellen, die eine geordnete Immunreaktion ermöglichen.

6.1 Ausblick

Lymphozyten, speziell einige Subklassen, wie die CD4-positiven T-Helferzellen koordinieren eine regulierte Immunantwort. Die im Pferd nachgewiesene Population von sezernierten, PSG-ähnlichen CEACAMs in dem Anteil der aktivierten Lymphozyten könnten eine entscheidende Rolle in diesem Regulationsmechanismus spielen, da sie im Gegensatz zu Zytokinen und Chemokinen deutlich stabiler sind und so Kommunikation der Immunzellen auch über weite Strecken im Körper ermöglichen.

Mit diesem Gedanken bildet die hier vorliegende Arbeit eine Grundlage für weitere Forschung auf diesem Gebiet. Die für einige Mitglieder dieser Genfamilie in anderen Spezies bereits nachgewiesenen homophilen und heterophilen Interaktionen müssten für die CEA-Mitglieder im Pferd noch nachgewiesen, sowie die damit beeinflussten Zusammenhänge und Wechselwirkungen der einzelnen Mitglieder in diesem Netzwerk untereinander überprüft werden.

7 Summary

The analysis of the carcinoembryonic antigen and pregnancy specific glycoprotein gene family of the horse

A well-regulated immune reaction is built upon the coordination of the single cells from the innate and the acquired immune system. Next to secreted molecules like cytokines and chemokines such a reaction is mainly mediated by surface molecules belonging to different receptor families found within the leucocyte receptor complex. Beside the well-known and analyzed families like the KIR- or the LIR-family, the CEA gene family belongs to them. This family is embedded within the extended region of the leucocyte receptor complex and is characterized for different mammalian species in a more or less large amount. In the genome of the horse clues for the existence of members belonging to the CEA gene family could be found and their availability was later experimentally proven. While the extension of this family is well examined in other species, like the human and in rodent species, for example mouse and rat, for horses such things are relatively unknown. Based on genome analyzations, partly confirmed during a bachelor thesis (Aleksic, 2010), it could be assumed that in the horse the expression of this family contain quite a few members, among which also secreted members are. Such secreted members are also known from other species developing a haemochorial placenta, in most cases the location where they are expressed, and are referred to as PSGs. In distinction to them the horse is building an epitheliochorial placentation in which the fetomaternal contact is marginally, except for the region of the endometrial cups, where a situation quite similar to this of the haemochorial placenta could be found. This specific members were already well characterized by the group of Robert Kammerer (Aleksic *et al*, 2016). There was a special eyemark on the membrane-anchored members of this family during the here presented research.

Another characteristic of this CEA gene family is the expression of signaling motives by an ITIM or ITAM localized in their cytoplasmatic tail. Hints for the development of such kind of motives are also apparent in the equine CEA gene family. The expression for two of the ITIM-receptor bearing members of the horse, CEACAM1 and CEACAM43 is already proven whereas the detected splice variations are yet known from the mouse. The remaining members meant to bear an ITIM or ITAM in their cytoplasmatic part, seemed to have lost this signaling motives. After sequence analyzing of this members in neither of this expressed versions of the CEACAMs a signaling motive could be detected.

Therefor some extraordinary motives like a special repetitive sequence could be characterized as an extracellular part of the CEACAM54, still present in the sequence of the finally expressed gene. Expression studies over a generation of a fusion protein *de facto* expression of this gene could be confirmed.

The only ITAM bearing member of the CEA genes in the horse, the CEACAM41, lost this motive based on the results here. In all of the here detected splice variations the loss of the transmembrane domain suggest a secreted molecule. In other characterized species, like the dog, where ITAM-bearing CEACAMs can be detected, this signaling motives are preserved and in difference to the horse rather duplicated.

Diverse from other species the expression pattern from the secreted PSG-like CEACAMs of the horse is not limited to the placental tissue but instead an increased expression upon the immunological cells and especially on the t-lymphocyte subpopulation was detected. The immunological importance of this secreted equine CEACAMs is underlined by the fact, that some members, like the CEACAM55, which is exclusively expressed upon CD4-positive T-cell, are only expressed on a particular subpopulation of the lymphocytes. Within the subpopulation of the t-cells helper cells can be located, which mediate a well-regulated immune reaction.

7.1 Outlook

Lymphocytes and especially some of their subsets like the CD4-positive T-helper cells are mediating a regulated immune response. The here identified population of secreted PSG in the horse like CEACAMs in this part of the activated lymphocytes could play a pivotal role in this regulation mechanism. Because in contrast to the cytokines and chemokines they are much more stable and can facilitate immunological communication between cells over a long distance in the body.

Upon this thought the here presented work is the basis for further research on this field. In other species hemophilic and heterophilic interactions between members of the CEA gene family were shown. Such an interaction as well as correlations and interactions of the different members of the CEACAMs have not been proven for horses so far and need to be done.

8 Quellen

1. Aleksic, D. (2010) Die Immunrezeptoren der equinen Karzinoembryonalen Antigen-Familie.
2. Aleksic, D., Blaschke, L., Mißbach, S., Hänske, J., Weiß, W., Handler, J., Zimmermann, W., Cabrera-Sharp, V., Read, J.E., de Mestre, A.M., O'Riordan, R., Moore, T., Kammerer, R. (2016) Convergent evolution of pregnancy-specific glycoproteins in human and horse. *Reproduction* 152 (3): 171-184.
3. Barclay, A.N. (2003) Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules. *Seminars in immunology* 15(4): 215-223
4. Barrow, A.D., Trowsdale, J. (2008) The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunological reviews* 224: 98-123.
5. Beauchemin N., Draber P., Dveksler G., Gold P., Gray-Owen S., Grunert F., Hammarström S., Holmes K.V., Karlsson A., Kuroki M., Lin S.H., Lucka L., Najjar S.M., Neumaier M., Obrink B., Shively J.E., Skubitz K.M., Stanners C.P., Thomas P., Thompson J.A., Virji M., von Kleist S., Wagener C., Watt S., Zimmermann W. (1999) Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Experimental Cell Research* 252 (2): 243-249.
6. Benchimol, S., Fuks, A., Jothy, S., Beauchemin, N., Shirota, K., Stanners, C.P. (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57 (2): 327-334.
7. Blois, S.M.; Tirando-González, I.; Wu, J.; Barrientos, G.; Johnson, B.; Warren, J.; Freitag, N.; Klapp, B.F.; Irmak, S.; Ergun, S.; Dveksler, G.S. (2012) Early Expression of Pregnancy-Specific Glycoprotein 22 (PSG22) by Trophoblast Cells Modulates Angiogenesis in Mice. *Biology of Reproduction* 86 (6): 191, 1–9.
8. Bohn, H. (1971) Nachweis und Charakterisierung von Schwangerschaftsproteinen in der menschlichen Placenta, sowie ihre quantitative immunologische Bestimmung im Serum schwangerer Frauen. *Archiv für Gynäkologie* 210: 440-457.
9. Brown, D., Trowsdale, J., Allen, R. (2004) The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 64 (3): 215-225.
10. Budt M., Michely B., Müller M.M., Reutter W., Lucka L. (2002) Secreted CEACAM1 splice variants in rat cell lines and in vivo in rat serum. *Biochemical and biophysical research communications* 292 (3): 749-755.
11. Buntru, A.; Kopp, K.; Voges, M.; Frank, R.; Bachmann, V.; Hauck, C.R. (2011) Phosphatidylinositol 3'-Kinase Activity Is Critical for Initiating the Oxidative Burst and Bacterial Destruction during CEACAM3-mediated Phagocytosis. *The Journal of biological chemistry* 286 (11): 9555-9566
12. Chang, C.L.; Semyonov, J.; Cheng, P.J.; Huang, S.Y.; Park, J.I.; Tsai, H.J.; Lin, C.Y.; Grützner, F.; Soong, Y.K.; Cai, J.J.; Hsu, S.Y. (2013) Widespread Divergence of the CEACAM/PSG Genes in Vertebrates and Humans Suggests Sensitivity to Selection. *PLoS One* 8 (4): e61701.
13. Chen, D.S.; Asanaka, M.; Yokomori, K.; Wang, F.-I. Hwang, S.B.; Li, H.-P.; Lai, M.M.C. (1995) A pregnancy-specific glycoprotein is expressed in the brain and serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *PNAS-Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 12095-12099.
14. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162 (1): 156-159.
15. Crocker, P.R., Paulson, J.C., Varki, A. (2007) Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews. Immunology* 7(4): 255-266.
16. De Mestre A.M., Noronha L., Wagner B., Antczak D.F. (2010) Split immunological tolerance to trophoblast. *The International journal of developmental biology* 54 (2-3): 445-455.
17. Demuth, J.P., De Bie, T., Stajich, J.E., Cristianini, N., Hahn, M.W. (2006) The Evolution of Mammalian Gene Families. *PLoS ONE* 1(1): e85.

18. De Vries, S.P., Bootsma, H.J., Hays, J.P., Hermans, P.W. (2009) Molecular Aspects of *Moraxella catarrhalis* Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73(3): 389-406
19. Dietz, O. (2006) *Handbuch der Pferdepraxis*. Enke Verlag 3. Auflage,
20. Doherty, A., de Magalhães, J.P. (2016) Has gene duplication impacted the evolution of Eutherian longevity? *Aging Cell* 15 (5): 978-980
21. Doyle, M.V., Lee, M.T., Fong, S. (1985) Comparison of the biological activities of human recombinant interleukin-2(125) and native interleukin-2. *Journal of biological response modifiers* 4 (1): 96-109.
22. Dveksler, G.S.; Dieffenbach, C.W.; Cardellichio, C.B.; McCuaig, K.; Pensiero, M.N.; Jiang, G.-S.; Beauchemin, N.; v. Holmes, K. (1993) Several Members of the Mouse Carcinoembryonic Antigen-Related Glycoprotein Family Are Functional Receptors for the Coronavirus Mouse Hepatitis Virus-A59. *Journal of Virology* 67: 1-8
23. Fetsch, A., Huebner, J., Langbein, I., Mueller, E., Borchers, K. (2007) Ermittlung des Immunstatus bei Pferden mit bzw. ohne equine Keratokunjunktivitis unter besonderer Berücksichtigung einer EHV-2-Infektion. *Tierärztliche Praxis* 35 (G): 356-362
24. Fey, K., Kolm, G. (2010) *Fohlenmedizin*. Enke Verlag 1. Auflage,
25. Finkenzeller D., Fischer B., Lutz S., Schrewe H., Shimizu T., Zimmermann W. (2003) Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 10 Expressed Specifically Early in Pregnancy in the Decidua Is Dispensable for Normal Murine Development. *Molecular and Cellular Biology* 23 (1): 272–279
26. Fitch, W.M. (1970) Distinguishing homologous from analogous proteins. *Systematic zoology* 19 (2): 99-113
27. Fong, S., Doyle, M.V. (1986) Response of bovine and porcine peripheral blood mononuclear cells to human recombinant interleukin 2(125). *Veterinary immunology and immunopathology* 11 (1): 91-100.
28. Fritsche, R. & Mach, J.-P. (1977) Isolation and Characterization of Carcinoembryonic Antigen (CEA) Extracted from Normal Human Colon Mucosa. *Immunochemistry* 14: 119-127.
29. Gold, P. & Freedman, S.O. (1965) Specific Carcinoembryonic Antigens of the Human Digestive System. *Journal of Experimental Medicine* 122: 467-481
30. Gray-Owen, S.D., Blumberg, R.S. (2006) CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nature reviews. Immunology* 6 (6): 433-46.
31. Greicius, G.; Severinson, E.; Beauchemin, N.; Öbrink, B.; Singer, B.B. (2003) CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *Journal of Leukocyte Biology* 74: 126-134.
32. Grüning G., Triplett L., Canady L.K., Allen W.R., Antczak D.F. (1995) The Maternal Leucocyte Response to the Endometrial Cups in Horses is Correlated with the Developmental Stages of the Invasive Trophoblast Cells. *Placenta* 16: 539-559
33. Ha, C.T.; Waterhouse, R.; Wessells, J.; Wu, J.A.; Dveksler, G.S. (2005) Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE₂ and TGF-β₁. *Journal of Leukocyte Biology* 77: 948-957.
34. Han, E., Phan, D., Lo, P., Poy, M.N., Behringer, R., Najjar, S.M., Lin, S.H. (2001) Differences in tissue-specific and embryonic expression of mouse Ceacam1 and Ceacam2 genes. *The Biochemical journal* 355 (Pt 2): 417-23
35. Hammarström, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Cancer Biology* 9: 67-81.
36. Hatakeyama K., Wakabayashi-Nakao K., Ohshima K., Sakura N., Yamaguchi K., Mochizuki T. (2013) Novel protein isoforms of carcinoembryonic antigen are secreted from pancreatic, gastric and colorectal cancer cells. *BMC Research Notes* 6:381

37. Hill, R.L., Delaney, R., Fellows, R.E., Lebovitz, H.E. (1966) The evolutionary origins of the immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 56 (6): 1762-1769
38. Hood L. und Hunkapiller T. (1991) Molecular evolution and the immunoglobulin gene superfamily. In: Osawa S. und Honjo T. (Hrsg.): *Evolution of Life*, 123-143, Springer Verlag, Tokyo
39. Hood, L., Kronenberg, M., Hunkapiller, T. (1985) T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 40 (2): 225-229.
40. Hsu, K.C., Chida, S., Geraghty, D.E., Dupont, B. (2002) The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological reviews* 190: 40-52.
41. Humphrey, M.B., Lanier, L.L., Nakamura, M.C. (2005) Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone. *Immunological reviews* 208: 50-65.
42. Kabithe, E., Hillegas, J., Stokol, T., Moore, J., Wagner, B. (2010) Monoclonal antibodies to equine CD14. *Veterinary immunology and immunopathology* 138 (1-2): 149-153
43. Kahn, W.N.; Teglund, S.; Bremer, K.; Hammarström, S. (1992) The Pregnancy-Specific Glycoprotein Family of the Immunoglobulin Superfamily: Identification of New Members and Estimation of Family Size. *Genomics* 12: 780-787
44. Kammerer, R., Stober, D., Singer, B.B., Öbrink, B., Reimann, J. (2001) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *Journal of immunology* 166 (11): 6537-6544
45. Kammerer, R.; Popp, T.; Singer, B.B.; Schlender, J.; Zimmermann, W. (2004) Identification of allelic variants of the bovine immune regulatory molecule CEACAM1 implies a pathogen-driven evolution. *Gene* 339: 99-109
46. Kammerer, R.; Popp, T.; Härtle, S.; Singer, B.B.; Zimmermann, W. (2007) Species-specific evolution of immune receptor tyrosine based activation motif-containing CEACAM1-related immune receptors in the dog. *BMC Evolutionary Biology* 7:196
47. Kammerer, R. & Zimmermann, W. (2010) Coevolution of activating and inhibitory receptors within mammalian carcinoembryonic antigen families. *BMC Biology* 8:12
48. Kataoka K., Takata Y., Nakajima A., Saito S., Huh N. (2000) A carcinoembryonic antigen family cDNA from mouse placenta encoding a protein with a rare domain composition. *Placenta* 21 (7): 610-614
49. Kawano, K.; Ebisawa, M.; Hase, K.; Fukuda, S.; Hijikata, A.; Kawano, S.; Date, Y.; Tsuneda, S.; Itoh, K.; Ohno, H. (2007) Psg18 Is Specifically Expressed in Follicle-associated Epithelium. *Cell Structure and Function* 32: 115-126
50. Khatua, B., Roy, S., Mandal, C. (2013) Sialic acids siglec interaction: A unique strategy to circumvent innate immune response by pathogens. *The Indian journal of medical research* 138 (5): 648-662
51. Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* 15 (20): 8125-8148
52. Kromer, B., Finkenzeller, D., Wessels, J., Dveksler, G., Thompson, J., Zimmermann, W. (1996) Coordinate expression of splice variants of the murine pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene family during placental development. *European journal of biochemistry* 242 (2): 280-287
53. Kruse, P.H., Matta, J., Ugolini, S., Vivier, E. (2014) Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology and Cell Biology* 92: 221–229
54. Kuespert, K.; Pils, S.; Hauck, C.R. (2006) CEACAMs: their role in physiology and patophysiology. *Cell Biology* 18: 565-571
55. Kuroki, M., Arakawa, F., Matsuo, Y., Oikawa, S., Nakazato, H., Matsuoka, Y. (1991) Three novel molecular forms of biliary glycoprotein deduced from cDNA clones from a human leukocyte library. *Biochemical and biophysical research communications* 176 (2): 578-585

56. Lanier, L.L. (2009) DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunological reviews*. 227 (1): 150-160
57. Lei, K.J., Sartwell, A.D., Pan, C.J., Chou, J.Y. (1992) Cloning and expression of genes encoding human pregnancy-specific glycoproteins. *The Journal of biological chemistry* 267 (23): 16371-16378
58. Lespinet, O., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Aravind, L. (2002) The role of lineage-specific gene family expansion in the evolution of eukaryotes. *Genome research* 12 (7): 1048-1059
59. Lisboa, F.A.; Warren, J.; Sulkowski, G.; Aparicio, M.; David, G.; Zudaire, E.; Dveksler, G.S. (2011) Pregnancy-specific Glycoprotein 1 Induces Endothelial Tubulogenesis through Interaction with Cell Surface Proteoglycans. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (9): 7577–7586
60. Markel G., Lieberman N., Katz G., Arnon T.I., Lotem M., Drize O., Blumberg R.S., Bar-Haim E., Mader R., Eisenbach L., Mandelboim O. (2002) CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *The Journal of immunology* 168 (6): 2803-2810
61. Markel, G., Achdout, H., Katz, G., Ling, K.L., Salio, M., Gruda, R., Gazit, R., Mizrahi, S., Hanna, J., Gonen-Gross, T., Arnon, T.I., Lieberman, N., Stren, N., Nachmias, B., Blumberg, R.S., Steuer, G., Blau, H., Cerundolo, V., Mussaffi, H., Mandelboim, O. (2004) Biological function of the soluble CEACAM1 protein and implications in TAP2-deficient patients. *European journal of immunology* 34 (8): 2138-2148
62. McLellan, A.S., Zimmermann, W., Moore, T. (2005) Conservation of pregnancy-specific glycoprotein (PSG) N domains following independent expansions of the gene families in rodents and primates. *BMC evolutionary biology* 5:39
63. Mealey, R.H., Littke, M.H., Leib, S.R., Davis, W.C., McGuire, T.C. (2008) Failure of low-dose recombinant human IL-2 to support the survival of virus-specific CTL clones infused into severe combined immunodeficient foals: lack of correlation between in vitro activity and in vivo efficacy. *Veterinary immunology and immunopathology* 121 (1-2): 8-22
64. Mißbach, S., Aleksic, D., Blaschke, L., Hassemer, T., Lee, K.J., Mansfeld, M., Hänke, J., Handler, J., Kammerer, R. (2018) Alternative splicing after gene duplication drives CEACAM1-paralog diversification in the horse. *BMC Evolutionary Biology* 18 (1): 32
65. Mironov, A.A., Fickett, J.W., Gelfand, M.S. (1999) Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Research* 9 (12): 1288-1293
66. Moyo, N.A., Marchi, E., Steinbach, F. (2013) Differentiation and activation of equine monocyte-derived dendritic cells are not correlated with CD206 or CD83 expression. *Immunology*. 139 (4): 472-483
67. Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M. (2014) *Janeway Immunologie*, Springer-Verlag GmbH Deutschland 7.Auflage
68. Natarajan, K., Mage, M.G., Margulies, D.H. (2006) *Immunoglobulin Superfamily*. eLS. John Wiley. & Sons
69. Nédellec P., Dveksler G.S., Daniels E., Turbide C., Chow B., Basile A.A., Holmes K.V., Beauchemin N. (1994) Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *Journal of Virology* 68 (7): 4525-4537
70. Noronha L.E., Antczak D.F. (2010) Maternal immune responses to trophoblast: the contribution of the horse to pregnancy immunology. *American journal of reproductive immunology* 64 (4): 231-244
71. Noronha, L.E.; Antczak, D.F. (2012) Modulation of T-cell Reactivity During Equine Pregnancy is Antigen Independent. *American Journal of Reproductive Immunology* 68: 107–115
72. Noronha, L.E.; Huggler, K.E.; de Mestre, A.M.; Miller, D.C.; Antczak, D.F. (2012) Molecular evidence for natural killer-like cells in equine endometrial cups. *Placenta*. 33 (5): 379-386

73. Öbrink, B. (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Cell Biology* 9: 616-626.
74. Pavlopoulou, A., Scorilas, A. (2014) A comprehensive phylogenetic and structural analysis of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family. *Genome biology and evolution* 6 (6): 1314-1326
75. Pils, S.; Gerrard, D.T.; Meyer, A.; Hauck, C.R. (2008) CEACAM3: An innate immune receptor directed against human-restricted bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 553-560
76. Pusztaszeri, G. & Mach, J.-P. (1973) Carcinoembryonic Antigen (CEA) in Non Digestive Cancerous and Normal Tissues. *Immunchemistry* 10: 197-204
77. Rajalingam, R. (2011) Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *The Korean journal of hematology* 46 (4): 216-228
78. Ranera B., Antczak D., Miller D., Doroshenkova T., Ryan A., McIlwraith C.W., Barry F. (2015) Donor-derived equine mesenchymal stem cells suppress proliferation of mismatched lymphocytes. *Equine Veterinary Journal* 48 (2): 253-60
79. Rebstock, S., Lucas, K., Thompson, J.A., Zimmermann, W. (1990) cDNA and gene analyses imply a novel structure for a rat carcinoembryonic antigen-related protein. *The Journal of biological chemistry* 265 (14): 7872-7879
80. Rebstock, S., Lucas, K., Weiss, M., Thompson, J., Zimmermann, W. (1993) Spatiotemporal expression of pregnancy-specific glycoprotein gene rncGM1 in rat placenta. *Developmental dynamics* 198 (3): 171-181
81. Rudert F., Saunders A.M., Rebstock S., Thompson J.A., Zimmermann W. (1992) Characterization of murine carcinoembryonic antigen gene family members. *Mammalian Genome* 3 (5): 262-273
82. Salaheldeen E., Kurio H., Howida A., Iida H. (2012) Molecular cloning and localization of a CEACAM2 isoform, CEACAM2-L, expressed in spermatids in mouse testis. *Molecular reproduction and development* 79 (12): 843-852
83. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265 (5596): 687-695
84. Sarantis, H., Gray-Owen, S.D. (2012) Defining the roles of human carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules during neutrophil responses to *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and immunity* 80 (1): 345-358
85. Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P., Hauck, C.R. (2004) Granulocyte CEACAM3 Is a Phagocytic Receptor of the Innate Immune System that Mediates Recognition and Elimination of Human-specific Pathogens. *The Journal of experimental medicine* 199 (1): 35-46
86. Scorilas, A., Chiang, P.M., Katsaros, D., Yousef, G.M., Diamandis, E.P. (2003) Molecular characterization of a new gene, CEAL1, encoding for a carcinoembryonic antigen-like protein with a highly conserved domain of eukaryotic translation initiation factors. *Gene* 310: 79-89
87. Shanley, D.K., Kiely, P.A., Golla, K., Allen, S., Martin, K., O'Riordan, R.T., Ball, M., Aplin, J.D., Singer, B.B., Caplice, N., Moran, N., Moore, T. (2013) Pregnancy-specific glycoproteins bind integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and inhibit the platelet-fibrinogen interaction. *PLoS One* 8 (2): e57491
88. Shive, W., Pinkerton, F., Humphreys, J., Johnson, M.M., Hamilton, W.G., Matthews, K.S. (1986) Development of a chemically defined serum- and protein-free medium for growth of human peripheral lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (1): 9-13
89. Singer B.B., Scheffrahn I., Heymann R., Sigmundsson K., Kammerer R., Öbrink B. (2002) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression and signaling in human, mouse, and rat leukocytes: evidence for replacement of the short cytoplasmic domain isoform by glycosylphosphatidylinositol-linked proteins in human leukocytes. *Journal of Immunology* 168 (10): 5139-5146

90. Singer B.B., Opp L., Heinrich A., Schreiber F., Binding-Liermann R., Berrocal-Almanza L.C., Heyl K.A., Müller M.M., Weimann A., Zweigner J., Slevogt H. (2014) Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *Public Library of Science one (PLoS 1)9* (4): e94106
91. Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Skubitz, A.P. (1996) CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 60 (1): 106-117
92. Snyder, S.K.; Wessner, D.H.; Wessells, J.L.; Waterhouse, R.M.; Wahl, L.M.; Zimmermann, W.; Dveksler, G.S. (2001) Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta1 by human monocytes. *American journal of reproductive immunology* 45: 205-216
93. Stern, N; Markel, G.; Arnon, T.I.; Gruda, R.; Wong, H.; Gray-Owen, S.D.; Mandelboim, O. (2005) Carcinoembryonic Antigen (CEA) Inhibits NK Killing via Interaction with CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. *The Journal of Immunology* 174: 6692-6701
94. Stern-Ginossar, N., Nedvetzki, S., Markel, G., Gazit, R., Betser-Cohen, G., Achdout, H., Aker, M., Blumberg, R.S., Davis, D.M., Appelmek, B., Mandelboim, O. (2007) Intercellular transfer of carcinoembryonic antigen from tumor cells to NK cells. *Journal of immunology* 179 (7): 4424-4434
95. Svenberg, T. (1976) Carcinoembryonic Antigen-like Substances of Human Bile. Isolation and Partial Characterization. *International Journal of Cancer* 17: 588-596
96. Tchoupa, A.K., Schuhmacher, T., Hauck, C.R. (2014) Signaling by epithelial members of the CEACAM family - mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell communication and signaling* 12: 27
97. Tchoupa, A.K., Lichtenegger, S., Reidl, J., Hauck, C.R. (2015) Outer membrane protein P1 is the CEACAM-binding adhesin of *Haemophilus influenzae*. *Molecular microbiology* 98 (3): 440-455
98. Teglund S., Olsen A., Khan W.N., Frängsmyr L., Hammarström S. (1994) The pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene cluster on human chromosome 19: fine structure of the 11 PSG genes and identification of 6 new genes forming a third subgroup within the carcinoembryonic antigen (CEA) family. *Genomics* 23 (3): 669-684
99. Terahara K., Yoshida M., Taguchi F., Igarashi O., Nochi T., Gotoh Y., Yamamoto T., Tsunetsugu-Yokota Y., Beauchemin N., Kiyono H. (2009) Expression of newly identified secretory CEACAM1(a) isoforms in the intestinal epithelium. *Biochemical and biophysical research communications* 383 (3): 340-346
100. Thomas, R., Matthias, T., Witte, T. (2010) Leukocyte immunoglobulin-like receptors as new players in autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology* 38 (2-3): 159-162
101. Thompson, J. und Zimmermann, W. (1988) The Carcinoembryonic Antigen Gene Family: Structure, Expression and Evolution. *Tumor Biology* 9: 63-83
102. Thompson, J.A.; Grunert, F.; Zimmermann, W. (1991) Carcinoembryonic Antigen Gene Family: Molecular Biology and Clinical Perspectives. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 5: 344-366
103. Thornton, J.W., DeSalle, R. (2000) Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annual review of genomics and human genetics* 1: 41-73
104. Van der Vuurst de Vries, A.R., Clevers, H., Logtenberg, T., Meyaard, L. (1999) Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling. *European journal of immunology* 29 (10): 3160-3167
105. Vilches, C., Parham, P. (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology* 20: 217-251
106. Viveiros M.M., Antczak D.F. (1999) Characterization of equine natural killer and IL-2 stimulated lymphokine activated killer cell populations. *Developmental and comparative immunology* 23 (6): 521-532

107. Voges, M.; Bachmann, V.; Kammerer, R.; Gophna, U.; Hauck, C.R. (2010) CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiology* 10: 117
108. Von Kleist, S. & Burtin, P. (1969) Isolation of a Fetal Antigen from Human Colonie Tumors. *Cancer Research* 29: 1961-1964
109. Von Kleist, S.; Chavanel, G.; Burtin, P. (1972) Identification of an Antigen from Normal Human Tissue That Crossreacts with the Carcinoembryonic Antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 2492-2494
110. Wade C.M., Giulotto E., Sigurdsson S., Zoli M., Gnerre S., Imsland F., Lear T.L., Adelson D.L., Bailey E., Bellone R.R., Blöcker H., Distl O., Edgar R.C., Garber M., Leeb T., Mauceli E., MacLeod J.N., Penedo M.C., Raison J.M., Sharpe T., Vogel J., Andersson L., Antczak D.F., Biagi T., Binns M.M., Chowdhary B.P., Coleman S.J., Della Valle G., Fryc S., Guérin G., Hasegawa T., Hill E.W., Jurka J., Kiiialainen A., Lindgren G., Liu J., Magnani E., Mickelson J.R., Murray J., Nergadze S.G., Onofrio R., Pedroni S., Piras M.F., Raudsepp T., Rocchi M., Røed K.H., Ryder O.A., Searle S., Skow L., Swinburne J.E., Syvänen A.C., Tozaki T., Valberg S.J., Vaudin M., White J.R., Zody M.C.; Broad Institute Genome Sequencing Platform; Broad Institute Whole Genome Assembly Team, Lander E.S., Lindblad-Toh K. (2009) Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326 (5954): 865-867
111. Wang, H., Wang, X., He, C., Li, H., Qing, J., Grati, M., Hu, Z., Li, J., Hu, Y., Xia, K., Mei, L., Wang, X., Yu, J., Chen, H., Jiang, L., Liu, Y., Men, M., Zhang, H., Guan, L., Xiao, J., Zhang, J., Liu, X., Feng, Y. (2015) Exome sequencing identifies a novel CEACAM16 mutation associated with autosomal dominant nonsyndromic hearing loss DFNA4B in a Chinese family. *Journal of human genetics* 60 (3): 119-126
112. Wakabayashi-Nakao K., Hatakeyama K., Ohshima K., Yamaguchi K., Mochizuki T. (2014) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4 (CEACAM4) is specifically expressed in medullary thyroid carcinoma cells. *Biomedical Research (Tokyo)* 35 (4): 237-242
113. Waterhouse, R.; Ha, C.; Dveksler, G.S. (2002) Murine CD9 Is the Receptor for Pregnancy-specific Glycoprotein 17. *Journal of Experimental Medicine* 195: 277-282
114. Wessells J., Wessner D., Parsells R., White K., Finkenzeller D., Zimmermann W., Dveksler G. (2000) Pregnancy specific glycoprotein 18 induces IL-10 expression in murine macrophages. *European journal of immunology* 30 (7): 1830-1840
115. Wikström, K.; Kjellström, G.; Öbrink, B. (1996) Homophilic Intercellular Adhesion Mediated by C-CAM Is Due to a Domain 1–Domain 1 Reciprocal Binding. *Experimental Cell Research* 227: 360–366
116. Williams, A.F., Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annual review of immunology* 6: 381-405
117. Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., Trowsdale, J. (2000) Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9): 4778-4783
118. Wu, J.A.; Johnson, B.L.; Chen, Y.; Ha, C.T.; Dveksler, G.S. (2008) Murine Pregnancy-Specific Glycoprotein 23 Induces the Proangiogenic Factors Transforming-Growth Factor Beta 1 and Vascular Endothelial Growth Factor A in Cell Types Involved in Vascular Remodeling in Pregnancy. *Biology of Reproduction* 79: 1054–1061
119. Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (2000) DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 192 (7): 1059-1068
120. www.carcinoembryonic-antigen.de/ (CEA homepage)

121. Wynne, F.; Ball, M. McLellan, A.; Dockery, P.; Zimmermann, W.; Moore, T. (2006) Mouse pregnancy-specific glycoproteins: tissue-specific expression and evidence of association with maternal vasculature. *Reproduction* 131: 721-732
122. Yin, S.A., Nolte, I. (2007) *Praxisleitfaden Hund und Katze*: Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft 2. Auflage
123. Zebhauser R., Kammerer R., Eisenried A., McLellan A., Moore T., Zimmermann W. (2005) Identification of a novel group of evolutionarily conserved members within the rapidly diverging murine Cea family. *Genomics* 86 (5): 566-580
124. Zebhauser, R. (2006) Charakterisierung eines Mausmodells für die Evaluierung neuer Mitglieder der CEA-Familie als mögliche Zielstrukturen für die Tumorthherapie. Dissertation. Onlinebibliothek LMU München
125. Zheng J., Miller K.K., Yang T., Hildebrand M.S., Shearer A.E., DeLuca A.P., Scheetz T.E., Drummond J., Scherer S.E., Legan P.K., Goodyear R.J., Richardson G.P., Cheatham M.A., Smith R.J., Dallos P. (2011) Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with alpha-tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (10): 4218-4223
126. Zhou G.Q., Hammarström S. (2001) Pregnancy-specific glycoprotein (PSG) in baboon (*Papio hamadryas*): family size, domain structure, and prediction of a functional region in primate PSGs. *Biology of Reproduction* 64 (1): 90–99

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Originalarbeiten

Mißbach S., Aleksic D., Blaschke L., Hassemer T., Lee K.J., Handler J., Kammerer K. Alternative splicing after gene duplication drives CEACAM1-paralog diversification in the horse. *BMC Evol. Biol.* 18:32 (2018) IF=3,2

Kammerer R., Mansfeld M., Hänske J., **Mißbach S.**, He X., Köllner B., Mouchantat S., Zimmermann W., Recent expansion and adaptive evolution of the carcinoembryonic antigen family in bats of the Yangochiroptera subgroup. *BMC Genomics* 18:717 (2017) IF=3,9

Aleksic D., Blaschke L., **Mißbach S.**, Hänske J., Weiß W., Handler J., Zimmermann W., Cabrera-Sharp V., Read J.E., de Mestre A.M., O’Riordan R., Moore T., Kammerer R. Convergent evolution of pregnancy-specific glycoproteins in the human and horses. *Reproduction* 152:171-184 (2016) IF=3,2

9.2 Kongressbeiträge (¹Vorträge, ²Poster)

²**Mißbach S.**, Hänske J., Aleksic D., Blaske L., Zimmermann W., Handler J., Kammerer R. Secreted CEA family members as immune regulators in the horse? 47th Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGfI). Erlangen, Germany, 12-15. Sep. 2017

¹Kammerer R., **Mißbach S.**, Hänske J., Lee J., Mansfeld M., Zimmermann W., Expansion of a well-balanced system results in multiple events of convergent evolution. 27th Annual International CEA Symposium, Los Angeles, USA, 10-12. Sep. 2017

¹Kammerer R., Aleksic D., Blaske L., Zimmermann W., Handler J., O’Riordan R., Moore T. **Mißbach S.**, Convergent evolution of pregnancy-specific glycoproteins (PSGs) in humans and horses. 19th Evolutionary Biology Meeting, Marseille, France, 15.-18. Sep. 2015

¹**Mißbach S.**, Aleksic D., Blaske L., Zimmermann W., Handler J., O’Riordan R., Moore T. and Kammerer R., Will the horse reveal the secrets from the secreted CEACAMs. 25th Annual International CEA Symposium, Washington, US, 17-18. Aug. 2015

¹Kammerer R., Hammacher T., Mansfeld M., **Mißbach S.**, Hänske J., Zimmermann W., Mouchantat S. The CEA Family in farm and wild animals: an update. 24th Annual International CEA Symposium, Wakayama, Japan, 07-10. Sep. 2014

¹**Mißbach S.**, Mansfeld M., Thomas F., Mouchantat S., Zimmermann W., Kammerer R., Control is nothing without control: Evolution of paired receptors. Meeting des VIA, Jena, Germany, 02. – 03. Mai 2014

¹**Mißbach S.**, Mansfeld M., Zimmermann W., Handler J., Moor T., Kammerer R., Adaptive evolution but conserved function of pregnancy-specific glycoproteins. 4. Arbeitstreffen “Implantation und Placentation“, Munich, 20. - 21. March 2014.

²Mißbach S., Thomas F., Handler J., Zimmermann W., Kammerer R., Pathogen-driven evolution of immune receptor gene families. Medical Biodefense Conference, Munich, Germany, 22. – 25. Oct. 2013

Mißbach S., Thomas F., Zimmermann W., Kammerer R. Diversity of the CEA Gene Families in Vertebrates. 23rd Annual International CEA Symposium, Toledo, USA, 15-18. August 2013

9.3 Veröffentlichung von Datensätzen:

Missbach,S., Aleksic,D., Blaschke,L., Hassemer,T., Lee,K.J., Mansfeld,M., Haenske,J., Handler,J., Kammerer,R. Alternative splicing after gene duplication drives CEACAM1-paralog diversification in the horse. MF564057-MF564071 GenBank (2018)

Aleksic D. Blaschke L., **Mißbach S.**, Kammerer R. Cloning of equine pregnancy-specific glycoproteins. KT124640 – KT124644 GenBank (2016)

10 Danksagung

In allererster Linie danke ich meinem Betreuer PD Dr. Robert Kammerer. Zum einen, weil er mir dieses interessante Thema für meine Dissertation bereitgestellt hat. Zum anderen, weil er immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich bei allen Belangen der Arbeit sowohl fachlich, als auch moralisch unterstützt hat.

Darüber hinaus möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Handler für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Franziska Thomas bedanken, die gute Seele des Labors, die mir auch bei allen methodischen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand und mich perfekt eingearbeitet hat. Es war eine große Freude mit ihr im Labor arbeiten zu dürfen.

Weiterhin danke ich den restlichen Mitarbeitern des Labors für Immungenetik und Immunrezeptorfunktion; Sibylle Kubald, Martin Mansfeld und Jana Hänske für die Unterstützung und die schöne Zeit im Labor.

Auch bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gregor Meyers möchte ich mich bedanken, da hier die ganzen Sequenzierungen für mich durchgeführt wurden.

Ein großer Dank gilt im Übrigen auch meiner ganzen Familie, die mich schon während dem Studium und über die Dissertation hinaus immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben.

Zuletzt geht mein Dank noch an meine fleißigen Korrekturleser, meine Mama, Elisa und Basti, für die schnelle und kompetente Korrektur meiner sämtlichen (Rechtschreib-)Fehler.

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 31.01.2019

(Sophie Mißbach)



9 783967 290219

mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-021-9