Charakterisierung von Genen des angeborenen Immunsystems in der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) nach holistischer Transkriptomanalyse in der Milz

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Judith Köbis, geb. am 21.10.1982 in Erfurt

aus Dummerstorf

Rostock, April 2013

urn:nbn:de:gbv:28-diss2014-0063-6

Gutachter:

1. **Gutachter:**

   PD. Dr. Tom Goldammer

   AG Fischgenetik (Institut für Genombiologie), Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf
2. **Gutachter:**

   Prof. Dr. Hans-Martin Seyfert

   AG Genanalyse (Institut für Genombiologie), Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf
3. **Gutachter:**

   Prof. Dr. Klaus Wimmers

   AG Genomik (Institut für Genombiologie), Leibniz-Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf
4. **Gutachter:**

   Apl. Prof. Dr. Hans-Joachim Schuberth

   AG Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Datum der Einreichung: 06.05.2013

Datum der Verteidigung: 17.12.2013

I INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS I
II ABBILDUNGSVERZEICHNIS IV
III TABELLENVERZEICHNIS VI
IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VII
1. EINLEITUNG 1
1.1 Das Immunsystem der Fische 3
1.1.1 Unterschiede der Immunsysteme der Fische und Säuger 3
1.1.2 Immunrelevante Organe der Fische 5
1.1.3 Das Komplementsystem - ein Überblick 8
1.1.3.1 Die Evolution des Komplementsystems 10
1.1.3.2 Funktionseinheiten des Komplementsystems 10
2. ZIELSETZUNG 16
3. MATERIAL & METHODEN 17
3.1 Material 17
3.1.1 Regenbogenforellen des Stamms TCO 17
3.1.2 Regenbogenforellen des Stamms BORN 17
3.1.3 Organe der Regenbogenforellen 18
3.1.4 Bakterienstämme und Zelllinen 18
3.1.5 Antikörper 18
3.1.6 Vektoren 19
3.1.7 Längenstandards 19
3.2 Methoden 19
3.2.1 Organpräparation aus Regenbogenforellen 19
3.2.2 Isolierung von DNA aus Forellen-Gewebe 20
3.2.3 Herstellung einer DNA-Bank mittels GenomeWalker™ DNA walking 20
3.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Forellengewebe 20
3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 22
3.2.6 Herstellung von cDNA (copy DNA) 22
3.2.7 Microarray-Experiment zur Identifizierung different exprimierter Gene 22
3.2.7.1 cDNA-Synthese mit 3DNA-Ankersequenz 23
3.2.7.2 Präparation der cDNA-Microarrays 24
3.2.7.3 Scannen und Auswerten der Microarrays 26
3.2.8 Validierung differenter Expressionswerte mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) 26
3.2.8.1 Herstellung eines externen Standards 27
3.2.8.2 Ablauf einer qRT-PCR 27
3.2.8.3 Statistische Bewertung der Berechnungen 28
3.2.9 Identifizierung von Transkriptvarianten mittels reversem *Northern Blot* 29
3.2.10 Versionen der Polymerasekettenreaktion 33

3.2.11 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese 35
3.2.12 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten 35
3.2.13 Elution von PCR-Produkten aus Agarosegelen 36
3.2.14 Klonierung von PCR-Produkten 36
3.2.15 DNA-Sequenzierung 38
3.2.16 *In silico*-Strukturanalyse von Kandidatengenen 39
3.2.17 Phylogenetische Stammbaumanalyse von Proteinsequenzen 39
3.2.18 Zellkulturtechniken 39
3.2.19 Infektion von Regenbogenforellen mit *A. salmonicida* 41

4. ERGEBNISSE 43

4.1 Transkriptomstudien in der Milz 43

4.1.1 Geringeres Expressionsniveau der meisten Gene im Stamm BORN 43
4.1.2 Klassifizierung der im Stamm BORN geringer exprimierten Gene 44
4.1.3 Darstellung der immunrelevanten different exprimierten Immungene 47
4.1.4 Validierung differenter Expression ausgewählter immunrelevanter Kandidatengene im Milzgewebe gesunder Regenbogenforellen 49

4.2 Strukturanalyse und Phylogenie unbekannter immunrelevanter Kandidatengene 50

4.2.1 Strukturanalyse von Genen der TLR-Kaskade 51
4.2.2 Strukturanalyse von Genen der Akuten Phase Reaktion 56
4.2.3 Strukturanalyse von Genen des Komplementsystems 59

4.3 Untersuchung von Transkriptvarianten mittels reversem *Northern Blot* 64

4.3.1 Nachweis von Transkriptvarianten des *Trout C-Polysaccharide Binding Protein 1*-Gens (*TCBP1*) 64
4.3.2 Nachweis von Transkriptvarianten des *C-type lectin domain family 4, member M*-Gens (*CLEC4M*) 65

4.4 Expressionsanalyse von Komplementgenen in Zellen und Geweben gesunder Regenbogenforellen der Stämme TCO und BORN 67

4.4.1 *in vivo*-Expressionsanalyse von Komplementgenen in der Milz 68
4.4.2 *in vivo*-Expressionsanalyse von Komplementgenen in den Kiemen 70
4.4.3 *in vitro*-Expressionsanalyse ausgewählter Komplementgene in Kiemen-Fibroblastenzellen (Zelllinie RTgill-W1) 72
4.4.4 *in vivo*-Expressionsanalyse ausgewählter Komplementgene in der Leber 73

4.5 Expressionsanalyse von Komplementgenen in den Kiemen der Forellenstämme TCO und BORN nach einer *A. salmonicida*-Infektion 74

4.5.1 Phänotypische Beobachtung der Milz im Infektionsverlauf 75
4.5.2 Expression ausgewählter Komplementgene im Infektionsverlauf 76

4.6 Expressionsanalyse von Komplementgenen in Kiemen-Fibroblasten nach einer *A. salmonicida*-Stimulation 85

5. DISKUSSION 87

5.1 Geringere Expression zahlreicher Gene im Stamm BORN 87

5.2 Sequenzaufklärung von acht neuen Immungenen in der Regenbogenforelle 89

5.3 Bestätigung von *TCBP1*- und *CLEC4M*-Transkriptvarianten 89

5.4 Biologisch signifikante Komplementexpression in Milz und Kiemen 93

5.5 Linienspezifische Komplementexpression in den Kiemen nach einer *A. salmonicida*-Stimulation 96

5.6 Aufregulation von Komplementgenen in Kiemen-Fibroblasten (Zelllinie RTgill-W1) nach Stimulation mit *A. salmonicida* 102

5.7 Erhöhte Diversität des Forellen-Komplements durch duplizierte Gene 104

6. AUSBLICK 108

7. ZUSAMMENFASSUNG 109

8. DANKSAGUNG 111

9. LITERATUR 112

ANHANG i

A Weitere Materialien i
B Different exprimierte Immungene in der Milz gesunder Forellen beider Stämme viii
C Auflistung der annotierten Sequenzen x
D Reverser *Northern Blot* von *TCBP1* in Milz, Kiemen und Leber xiv
E Ergänzung der Messwerte des Ergebnisteils 4.5 xv
F Signifikant regulierte Gene nach Infektion in den Kiemen xviii

Lebenslauf

Veröffentlichungen und Fachvorträge/Poster

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Aktivierungsschema des Komplementsystems der Regenbogenforelle. 9
Abbildung 2 Verwendete Längenstandards. 19
Abbildung 3 Auftrennung von Gesamt-RNA aus Milzgewebe von 12 TCO-Forellen zur Qualitätsprüfung. 21
Abbildung 4 Schematischer Überblick über den Ablauf des Microarray-Experiments. 23
Abbildung 5 Beispiel für eine Standard-Eichgerade. 27
Abbildung 6 Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse 28
Abbildung 7 Aufbau eines Kapillarblots. 31
Abbildung 8 Funktionelle Klassifizierung different exprimierter Gene im Milzgewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN. 44
Abbildung 9 Expressionsvalidierung der immunrelevanten Kandidatengene im Milzgewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN. 49
Abbildung 10 Schematische Darstellung der hypothetischen Proteinstruktur von ST2L. 51
Abbildung 11 Alignment und Stammbaum von ST2L. 52
Abbildung 12 Schematische Darstellung der charakteristischen Proteindomänen von IRAK3. 53
Abbildung 13 Alignment und Stammbaum von IRAK3. 54
Abbildung 14 Schematische Darstellung der hypothetischen Proteinstruktur von MARCH3. 55
Abbildung 15 Alignment und Stammbaum von MARCH3. 55
Abbildung 16 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur der Isoform 1 von TCBP1. 56
Abbildung 17 Alignment und Stammbaum von TCBP1. 57
Abbildung 18 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur von TCBP2. 58
Abbildung 19 Alignment und Stammbaum von TCBP2. 58
Abbildung 20 Schematische Darstellung der Proteindomänen der CLEC4M-Isoformen. 59
Abbildung 21 Alignment und Stammbaum von CLEC4M. 60
Abbildung 22 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur von CD93. 61
Abbildung 23 Alignment und Stammbaum von CD93. 62
Abbildung 24 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur von CFD. 63
Abbildung 25 Alignment und Stammbaum von CFD. 63
Abbildung 26 Schematische Darstellung der *TCBP1*-Transkriptvarianten 1 bis 5. 64
Abbildung 27 Reverser *Northern Blot* des Gens *TCBP1* zum Nachweis von Transkriptvarianten in der Leber gesunder Regenbogenforellen (linienunabhängig). 65
Abbildung 28 Schematische Darstellung der Exons von *CLEC4M* und der Transkriptvariante. 66
Abbildung 29 Reverser *Northern Blot* des Gens *CLEC4M* zum Nachweis einer Transkriptvariante *CLEC4M-1* in Milz, Kiemen, Niere und Leber gesunder Regenbogenforellen (linienunabhängig). 66
Abbildung 30 Relative Expression der Komplementgene im Milzgewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN ermittelt durch qRT-PCR. 68
Abbildung 31 Relative Expression der Komplementgene im Kiemengewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN ermittelt durch qRT-PCR. 70
Abbildung 32 Relative Expression der Komplementgene in Kiemen-Fibroblastenzellen der Zelllinie RTgill-W1 bei 20°C ermittelt durch qRT-PCR. 72
Abbildung 33 Relative Expression der Komplementgene im Lebergewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN ermittelt durch qRT-PCR. 73
Abbildung 34 Somatischer Index (SI) der Milz beider Forellenstämme zu Beginn und nach der Infektion. 75
Abbildung 35 Relative Expression des Gens *TCBP1* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 76
Abbildung 36 Relative Expression des Gens *C1r/C1s* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 77
Abbildung 37 Relative Expression des Gens *C2-B* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 77
Abbildung 38 Relative Expression des Gens *C4* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 78
Abbildung 39 Relative Expression der duplizierten Gene *C3-1*, *C3-3* und *C3-4* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 78
Abbildung 40 Relative Expression der Gene *MBL1* und *MBL2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 80

Abbildung 41 Relative Expression der duplizierten Gene *CFB1* und *CFB2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 81
Abbildung 42 Relative Expression des Gens *CFD* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 81
Abbildung 43 Relative Expression der duplizierten Gene *C7-1* und *C7-2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 82
Abbildung 44 Relative Expression der Gene *CFI* und *CFH* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 83
Abbildung 45 Relative Expression der duplizierten Gene *CD59-1* und *CD59-2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 84
Abbildung 46 Relative Expression des Gens *C3aR* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN. 85
Abbildung 47 Relative Expression ausgewählter Komplementgene in Kiemen-Fibroblastenzellen der Zelllinie RTgill-W1 nach einer 24 stündigen Stimulation mit attenuierten *A. salmonicida* ($1x10^4$). 86
Abbildung 48 Anzahl signifikant regulierter Gene zu den gemessenen Zeitpunkten während einer *A. salmonicida*-Infektion in den Kiemen der Regenbogenforellenstämme TCO und BORN. 98
Abbildung 49 Relative Expression duplizierter Komplementgene in Milz, Kiemen und Leber gesunder Regenbogenforellenstämme TCO und BORN. 105
Abbildung 50 Reverser *Northern Blot* des Gens *TCBP1* zum Nachweis von Transkriptvarianten in Milz, Kiemen und Leber gesunder Regenbogenforellen (linienunabhängig). xv

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Übersicht über validierte Expressionsunterschiede der Kandidatengene im Milzgewebe beider Stämme mittels qRT-PCR. 50
Tabelle 2 Überblick über die innerhalb dieser Arbeit sequenzierten mRNA-Sequenzen..... 51
Tabelle 3 Überblick über die Transkriptvarianten von *TCBP1*. 64
Tabelle 4 Überblick über *CLEC4M* und die Transkriptvariante..... 66
Tabelle 5 Übersicht über die fünf meist exprimierten Gene in Geweben/Zellen gesunder Forellen. 67
Tabelle 6 Übersicht über Expressionsunterschiede der Komplementgene im Milzgewebe zwischen gesunden TCO- und BORN-Forellen ermittelt durch qRT-PCR..... 69
Tabelle 7 Übersicht über Expressionsunterschiede der Komplementgene in Kiemengewebe zwischen gesunden TCO- und BORN-Forellen ermittelt durch qRT-PCR..... 71
Tabelle 8 Übersicht über Expressionsunterschiede der Komplementgene in Lebergewebe zwischen gesunden TCO- und BORN-Forellen ermittelt durch qRT-PCR..... 74
Tabelle 9 Überblick über die Expressionsunterschiede von *TCBP1* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen. 76
Tabelle 10 Überblick über die Expressionsunterschiede von C1r/C1s zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen. 77
Tabelle 11 Überblick über die Expressionsunterschiede von *C2-B* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen. 77
Tabelle 12 Überblick über die Expressionsunterschiede von *C4* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen. 78
Tabelle 13 Übersicht über Expressionsunterschiede für *C3-1*, *C3-3* und *C3-4* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten. 79
Tabelle 14 Überblick über die Expressionsunterschiede von *MBL1* und *MBL2* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen. 80
Tabelle 15 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *CFB1* und *CFB2* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten. 81
Tabelle 16 Überblick über die Expressionsunterschiede von *CFD* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen. 81
Tabelle 17 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *C7-1* und *C7-2* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten..... 82
Tabelle 18 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *CFI* und *CFH* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten..... 83
Tabelle 19 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *CD59-1* und *CD59-2* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten. 84
Tabelle 20 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *C3aR* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten..... 85
Tabelle 21 Überblick über die Expressionsunterschiede der Gene nach einer Stimulation mit *A. salmonicida* nach 24h. 86
Tabelle 22 Überblick über die Expressionsunterschiede der Genexpression ausgewählter Gene in der Milz und den Kiemen im Vergleich zur Leber. 94
Tabelle 23 *Primer* für qRT-PCR-Reaktionen..... iii
Tabelle 24 *Primer* für Sequenzaufklärung v
Tabelle 25 Primer für reversen *Northern Blot*..... vii
Tabelle 26 Überblick über die mittels Microarray-Analyse identifizierten Immungene mit differenter Expression im Milzgewebe gesunder Regenbogenforellen der Stämme TCO und BORN. viii
Tabelle 27 Expressionsunterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten in den Forellenstämmen TCO und BORN..... xv
Tabelle **28** Überblick über signifikant regulierte Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion in den Forellenstämmen TCO und BORN. xviii

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
(x) g	Erdbeschleunigung	et al.	*et alii* (und andere)
°C	Grad Celsius	FBS	Fötales Bovines Serum
µg	Mikrogramm	FC	*Fold Change* (x-facher Expressionsunterschied)
µl	Mikroliter	g	Gramm
aa	Aminosäure	GALT	*Gut-Associated Lymphoid Tissue*
APP	Akute-Phase-Protein	GIALT	*Gill-Associated Lymphoid Tissue*
AS	alternatives Spleißen	h	Stunde(n)
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*	H_2O_{bid}	H_20, doppelt destilliert
Bp	Basenpaar(e)	H_2O_{dest}	H_20, destilliert
BSA	*Bovine Serum Albumin*	HMGB1	*High-Mobility Group Box 1*
C1QL4	*Complement Component 1, q Subcomponent-Like 4*	ILT	*Interbranchial Lymphoid Tissue*
C1QLAS	*C1q-Like Adipose Specific Protein*	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
C3aR	C3a-Rezeptor	IRAK3	*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 3*
C5aR	C5a-Rezeptor	KBE	Kolonienbildende Einheit
CD93	*Complement Component C1q Receptor-like Protein*	Kbp	Kilobasenpaar(e)
cDNA	*copy* DNA	kDa	Kilodalton
CFB	*Complement Factor B*	kg	Kilogramm
CFD	*Complement Factor D*	L	Liter
CFH	*Complement Factor H*	M	Molar (Mol/l)
CFI	*Complement Factor I*	mA	Milliampere
CFP	*Complement Factor P* (Properdin)	MAC	*Membrane Attack Complex*
cGRASP	*consortium for Genomic Research on All Salmon Project*	MALT	*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*
CLEC14A	*C-type Lectin Domain Family 14, member A*	MARCH3	Membran-assoziiertes (C3HC4) Ring-Finger-3 (Protein)
CLEC4M	*C-type Lectin Domain Family 4, member M*	MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
cm^2	Quadratzentimeter	MBL	Mannose-bindendes Lektin
CRP	C-reaktives Protein, Pentraxin	mg	Milligramm
Ct	*Cycle threshold*	min	Minute
Cy3	Cyanin 3	mind.	mindestens
Cy5	Cyanin 5	PBS	*Phosphate Buffered Saline*
d	Tag(e)	PCR	*Polymerase Chain Reaction*
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat	pH	pH-Wert
DEPC	Diethylpyrocarbonat	pI	Isoelektrischer Punkt
DIG	Digoxigenin	pmol	Pikomolar
DMSO	Dimethylsulfoxid	PSU	*Practical Salinity Units*
DNA	Desoxyribonukleinsäure	qRT-PCR	quantitative *Real-Time*-PCR
DTT	Dithiothreitol	r	Radius

RACE	*Rapid Amplification of cDNA Ends*
rcf	*relative centrifugal force*
RING	*Really Interesting New Gene*
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg, Einheit des Sedimentationskoeffizienten
s	Sekunde
SALT	*Skin-Associated Lymphoid Tissue*
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts (*Standard Error of Measurement*)
SOB	*Super Optimal Broth*
sog.	sogenannt
SSC	Saline-Sodium Citrate
ST2L	*Interleukin 1 Receptor-Like 1*
subsp	Subspezies
t	Zeit
T_a	*Anealing*-Temperatur
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tryptone Soya Broth
TCBP1/2	*Trout C-Polysaccharide Binding Protein* 1/2
TCO	Tacoma
TE	Tris-EDTA
T_m	Schmelztemperatur
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tv	Transkriptvariante
U	*Units*
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
UTR	*Untranslated Region*
UV	Ultra Violett
V	Volt
v/v	*volume per volume*
vgl.	Vergleich
Vol.	Volumen
w/v	*weight per volume*
w/w	*weight per weight*

1. EINLEITUNG

Die wachsende Weltbevölkerung sowie eine ernährungsbewusste Gesellschaft lassen den Fischkonsum und entsprechenden Bedarf seit 20 Jahren stetig steigen. Der weltweite Verzehr von Fisch pro Kopf stieg von durchschnittlich 9.9 kg in den 1960er Jahren auf 18.4 kg im Jahr 2009 (FAO, 2012). Dieser übersteigt aber bei Weitem die Menge, die noch durch konventionelle Fischerei bereitgestellt werden kann. Bereits 50% der weltweiten Fischversorgung erfolgt durch Aquakulturen, wobei China der größte Produzent ist (Bostock *et al.*, 2010). Die Aquakultur ist der am stärksten wachsende Sektor der Nahrungsmittelindustrie. Allerdings fordert der anspruchsvolle und umweltbewusste Verbraucher auch eine nachhaltige Fischproduktion, die nicht nur Umwelt und Ressourcen entlastet, sondern auch langfristig die Wildbestände. Die Überdüngung von Gewässern, der Verlust an Naturräumen und der Eintrag von Schadstoffen sind dabei viel kritisierte Punkte. Zudem werden viele Zuchtfische mit Fischöl und -mehl gefüttert, wodurch wiederum Wildfischbestände gefährdet sind.

Vor allem Fische in offenen Teich- oder Meerwasseranlagen sind einer Vielzahl biotischer und abiotischer Stressoren ausgesetzt, die Wegbereiter für virale und bakterielle Fischkrankheiten sind und somit hohen wirtschaftlichen Schaden bedeuten können. Die Erkrankung bereits weniger Fische ist nicht nur eine Bedrohung für den gesamten Bestand, sondern sollte auch hinsichtlich des Tier- und Verbraucherschutzes vermieden werden. Der Ausbruch von Krankheiten erfolgt häufig durch eine Stresssituation, wie z.B. hohe Wassertemperaturen bzw. deren Schwankungen, das Absinken des Sauerstoffgehalts, Abfischung, Sortierung und den Transport der Fische. Ausbrüche von VHS (Virale Hämorrhagische Septikämie), IHN (Infektiöse Hämatopoetische Nekrose) und KHV (Koi Herpes Virus Infektion) werden immer wieder verzeichnet, aber auch Rotmaulseuche und die besonders für Salmoniden gefährliche Furunkulose stellen eine Gefahr für Fische in Aquakulturen dar (Hastein und Lindstad, 1991). Die Verwendung von Antibiotika ist allerdings nicht erwünscht, da ein Eintrag in die Umwelt oder eine Übertragung von Resistenzen auf menschliche Pathogene befürchtet und außerdem qualitativ hochwertige Fischerzeugnisse nicht gewährleistet werden (Hadidi *et al.*, 2008; Welch *et al.*, 2007).

Eines der Ziele der derzeitigen Aquakulturforschung ist deshalb eine stressminimierte Fischhaltung. Die Erforschung von Krankheitsresistenzen steht dabei im Vordergrund (Odegard *et al.*, 2011). Dies trifft für die deutsche Aquakulturforschung insbesondere zu, da insgesamt nur

drei Impfstoffe zugelassen sind, die alle der Bekämpfung der Rotmaulseuche bei Regenbogenforellen dienen (www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-tiere/fische/fische-node.html, 2013). Zudem sind aktuell nur wenige effektive Impfstoffe für die Fischhaltung auf dem internationalen Markt erhältlich (Harun *et al.*, 2011) und nur wenig ist bekannt über Impfstrategien oder Immunstimulanzien im Allgemeinen. Die Zucht standortgerechter, an regionale Umweltstressoren angepasster Fischlinien stellt eine nachhaltige Alternative zur Nutzung von Impfstoffen dar, die gerade auch in Deutschland dazu beitragen kann, die Unabhängigkeit von Fischimporten wieder zu erhöhen. Eine Voraussetzung für die Erzeugung derartiger Fischlinien besteht darin, zunächst die molekularen Prinzipien unterschiedlicher Krankheitsanfälligkeiten von Fischen gegenüber Pathogenen und deren Abwehrmechanismen zu verstehen. Dazu sind die Aufklärung von Mechanismen des angeborenen und adaptiven Immunsystems der Knochenfische sowie die Identifizierung noch unbekannter, immunrelevanter Moleküle der Knochenfische notwendig. Die vorliegende Arbeit soll, basierend auf vergleichenden molekularen Untersuchungen von in die Pathogenabwehr involvierten Kandidatengenen zwischen zwei unterschiedlich stressanfälligen Zuchtlinien der Regenbogenforelle, dazu einen Beitrag leisten.

Bei den eingesetzten Forellen handelt es sich einerseits um eine regionale Zuchtlinie, den Stamm BORN, und eine üblicherweise in Deutschland in der Aquakultur genutzte importierte Zuchtlinie (in dieser Arbeit als Stamm TCO bezeichnet). Vergleichende Voruntersuchungen zwischen beiden Stämmen zeigten eine geringere Anfälligkeit des Stamms BORN gegenüber dem Fischpathogen *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (*A. salmonicida*) (Korytář *et al.*, 2009) sowie eine gleichbleibende Nahrungsaufnahme trotz Temperaturstress (Anders, 2010) und daraus folgend höhere Überlebensraten bzw. Abwachsleistungen. Mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) erfolgte die quantitative Erfassung an aktivierten MHCII-Molekülen im Peritoneum befindlicher Abwehrzellen von Regenbogenforellen nach Infektion mit *A. salmonicida*. Während im Stamm BORN eine zeitlich sehr schnelle Hochregulation der MHCII-Molekülanzahl bereits nach sieben Tagen erfolgte, lag die Molekülanzahl im Stamm TCO erst nach 21 Tagen auf etwa gleichem Niveau. Damit konnte vermutet werden, dass das erworbene Immunsystem des Stamms BORN reaktiver ist als das des Stamms TCO (Köllner *et al.*, nicht publiziert). Zudem wurde festgestellt, dass die Importforellen nach einem ungewöhnlich schnellen frühsommerlichen Anstieg und danach weiter konstant hohen Wassertemperaturen (22-27°C) in einer Teichanlage die Nahrungsaufnahme einstellten und dadurch im Wachstum

stagnierten, wohingegen die BORN-Forellen normal weiterfraßen und im Wachstum nicht beeinträchtigt waren (Rebl *et al.*, 2013).

1.1 Das Immunsystem der Fische

Über die Hälfte der rezenten Wirbeltierarten gehören zu den Fischen (ca. 31000 von 58000 Arten), welche u.a. durch eine hohe Diversität des Immunsystems gekennzeichnet sind (Wilson und Reeder, 2005). Dieses entspricht in den Grundzügen dem der Säuger und alle Faktoren für eine vollständige Immunantwort sind vorhanden (Watts *et al.*, 2001). Allerdings entwickelten sich vor allem innerhalb der Gruppe der Knochen- und Lachsfische, welche aufgrund von einer bzw. zwei zusätzlichen Genomduplikationen zusätzliche Gene/Faktoren besitzen, Besonderheiten und teilweise starke Abweichungen im Vergleich zu dem der Säugetiere.

1.1.1 Unterschiede der Immunsysteme der Fische und Säuger

Der morphologisch auffälligste Unterschied der Immunsysteme von Fisch und Säuger ist, dass den Fischen sowohl Knochenmark als auch Lymphknoten fehlen. Ein Ersatz dafür ist vermutlich die Niere bzw. ein spezialisierter Teil, die sogenannte Kopfniere, welche ein wichtiges primäres und sekundäres lymphatisches Organ in den echten Knochenfischen (*Teleostei*) darstellt (Press und Evensen, 1999). Trotzdem scheint ein vom Blutkreislauf getrenntes lymphatisches System vorhanden zu sein (Wardle, 1971).

Die im Säuger überaus wichtige adaptive Immunantwort ist im Fisch unterentwickelt und stark verlangsamt (Watts *et al.*, 2001). Dafür scheint das angeborene Immunsystem der Fische viel komplexer und diverser als das der Säuger. Da Fische im Wasser in ständigem Kontakt mit opportunistischen Mikroorganismen und potenziellen Pathogen sind, benötigen sie eine besonders frühe und schnelle Bekämpfung von Krankheitserregern. Eine Studie von Vasta *et al.* (2011) zeigt, dass Fische bspw. ein besonders komplexes Lektin-Repertoire besitzen. Alle im Säuger bekannten Lektine sind auch im Fisch vorhanden, darüber hinaus aber zusätzlich fisch-spezifische Komponenten. Lektine sind bspw. beteiligt an der Erkennung und Opsonisierung pathogener Oberflächen, indem sie an die Zuckermoleküle auf der Oberfläche binden. Ein weiterer Teil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem, welches in Säugern und auch in Fischen gut untersucht ist. Auch hier sind alle im Säuger vorkommenden Faktoren im Fisch vorhanden, mit Ausnahme von membrangebundenen Regulatoren, wie dem *Decay Accelerating Factor* (Nakao *et al.*, 2011). Das Komplementsystem der Fische ist charakterisiert

durch einige Besonderheiten. Aufgrund der Abhängigkeit der Fische von ihrer Umgebungstemperatur werden auch Immunfunktionen stark von dieser beeinflusst. Niedrige Umgebungstemperaturen können immunsuppressive Auswirkungen haben, wodurch eine entsprechend hohe Anfälligkeit für Krankheiten besteht (Bly und Clem, 1992). Vor allem die Aktivität des adaptiven Immunsystems der Fische ist bei kalten Temperaturen vermindert. Ein Ausgleich dafür bietet das unspezifische Immunsystem, wie bspw. das Komplementsystem, welches auch bei bedeutend geringeren Temperaturen und einer größeren Temperaturspanne aktiv ist als im Säuger (Le Morvan *et al.*, 1998). Optimale Temperaturen für die Forelle liegen zwischen 10 bis 20°C, allerdings verlangsamt sich auch im Fisch die Reaktion des Immunsystems bei Temperaturen unter 10°C (Nikoskelainen *et al.*, 2004). Ein weiteres besonderes Merkmal ist der gegenüber höheren Vertebraten 5 bis 10-fach erhöhte Titer des alternativen Wegs des Komplementsystems (Sunyer und Tort, 1995). Die gegenüber Säugern und anderen Vertebraten stark erhöhte Diversität äußert sich in der Existenz duplizierter Gene, wodurch viele der Komplementfaktoren als Isoformen vorliegen. Bekannt ist dies in der Regenbogenforelle bisher für die Gene *C3*, *C7*, *CFB*, *CD59* und *CFP*. Für die jeweiligen Isoformen wurden bereits verschiedene Expressionsorte bestimmt, was auf eine spezifische Funktion hinweisen könnte. Für die drei C3-Isoformen der Goldbrasse (*Sparus aurata*) wurden sogar unterschiedliche Bindeeigenschaften für Bestandteile pathogener Oberflächen identifiziert, was das Erkennungsspektrum von Pathogenen tatsächlich erhöhen könnte (Sunyer *et al.*, 1997). Auch der Syntheseort des Komplementsystems trägt zur frühen und schnellen Bekämpfung eingedrungener Pathogene bei. Das Komplementsystem der Fische agiert nicht, wie im Säuger, hauptsächlich in Serum und Lymphe, sondern tatsächlich an den Eintrittspforten wie Haut, Darm und Kiemen. Eine umfassende Studie zur Expression der Gene *C3*, *C7*, *C4*, *C5* und *CFB* veröffentlichten Lovoll und Kollegen (Lovoll *et al.*, 2007).

Auch das adaptive Immunsystem unterscheidet sich von dem höherer Vertebraten. Während im Säuger fünf Antikörperklassen (AK-Klassen) bekannt sind (IgA, IgD, IgE, IgM, IgG), wurde lange Zeit angenommen, dass im Fisch lediglich die AK-Klasse IgM existiert, bis man im Wels und Atlantischen Lachs auch die AK-Klasse IgD identifizieren konnte (Wilson *et al.*, 1997; Hordvik *et al.*, 1999). 2005 wurde dann ein weiterer Isotyp, IgT, in der Regenbogenforelle entdeckt und beschrieben (Hansen *et al.*, 2005). Kürzlich konnten Zhang *et al.* (2011) diesen noch näher charakterisieren, wobei eine Darm-spezifische Expression und Funktion gefunden wurde. Obwohl weniger Immunglobuline im Fisch vorhanden sind, verschlechtert dies nicht die

Möglichkeiten einer adäquaten spezifischen Immunantwort. Kaattari *et al.* (1998) identifizierten mehrere Redoxformen des IgM-Antikörpers in Regenbogenforellen, was zu einer erhöhten Bindung von Epitopen führt.

1.1.2 Immunrelevante Organe der Fische

Im Folgenden werden Organe besprochen, die in den Knochenfischen an der Immunabwehr beteiligt sind. Da sich die Analysen innerhalb dieser Arbeit hauptsächlich auf die Milz und die Kiemen stützen, werden diese ausführlicher beschrieben.

Thymus

Der Thymus der Fische wurde 1977 von Ellis als säugeräquivalentes, primäres lymphatisches Organ beschrieben. Im Fisch befindet sich dieser an der oberen Ecke des Kiemendeckels und gilt als Hauptort der T-Zell-Entwicklung (Bowden *et al.*, 2005). Die Knorpel- und die Knochenfische sind phylogenetisch die ersten Klassen der Wirbeltiere, die einen definierten Thymus besitzen (Rasmussen und Arnason, 1999).

Niere

Der Hauptteil der Niere hat, ebenso wie im Säuger, eine exkretorische Funktion. Der vordere Teil der Niere, die sog. Kopfniere, ist aber ein myeloisch-lymphatisches Gewebe mit hämatopoetischer Funktion (Fänge, 1986). Dieser Teil zeigt morphologische Ähnlichkeiten zum Knochenmark höherer Vertebraten (Meseguer *et al.*, 1995) und gilt deshalb als Säuger-Äquivalent zum Knochenmark (Zapata, 1979). Gleichzeitig dient die Kopfniere aber auch als sekundäres lymphatisches Organ, da sie an der Auslösung und Förderung inflammatorischer Kaskaden beteiligt ist (Kaattari und Irwin 1985). In der Kopfniere lokalisierte Makrophagen und Lymphozyten sind in der Lage, nach dem Kontakt mit Pathogenen aus dem Blutstrom, eine Immunantwort auszulösen. Außerdem ist sie der wichtigste der Ort der Antikörperproduktion (Rijkers *et al.*,1980).

Milz

Die Milz ist das wichtigste sekundäre Lymphorgan im Fisch (Hansen *et al.*, 2005) und spielt somit eine große Rolle, den Gesundheitsstatus eines Organismus aufrecht zu erhalten (Van Muiswinkel *et al.*, 1991). Im Menschen ist sie das wichtigste Organ der bakteriellen Bekämpfung (Mebius und Kraal, 2005). Die Milz der Knochenfische befindet sich in der Nähe des Magens im

dorsalen Mesenterium mit einer eigenständigen Blut- und Nervenversorgung. Die Milz der Lachse wiegt zwischen 0.04-0.86% des Körpergewichts, abhängig von saisonalen Veränderungen. Die Struktur der Milz variiert innerhalb der Knochenfische und ist im Allgemeinen von einer Bindegewebskapsel umgeben. Das Parenchym, bestehend aus Blutgefäßen, Ellipsoiden, roter und weißer Pulpa, ist ähnlich dem höherer Vertebraten (Fänge und Nilsson, 1985). Zwischen der nicht-lymphatischen roten Pulpa und der weißen Pulpa befindet sich die marginale Zone, in welcher einige myeloide und lymphatische Zellen lokalisiert sind. Durch diese Zone zieht ein Blutstrom, aus welchem Pathogene direkt von Makrophagen gefiltert werden können, beschrieben für Säuger von Kraal (2006). Der Hauptteil des Milzgewebes besteht aus roter Pulpa mit zellulärem Retikulum, durchzogen von blutbildendem Gewebe und Blutsinussen, wohingegen die weiße Pulpa in den Knochenfischen nur wenig entwickelt ist und mit diffus verteilten Lymphozyten durchsetzt ist (Fänge und Nilsson, 1985). Diese sind meist mit Ellipsoiden verbunden (Quesada *et al.*, 1990), terminalen Kapillaren, die von einer mit Makrophagen besetzten dünnen Epithelschicht umgeben sind (Van Muiswinkel *et al.*, 1991). Die Hauptzelltypen im Milzparenchym sind Lymphozyten und Makrophagen (Fänge und Nilsson, 1985). In den lympho-hämatopoetischen Geweben der meisten Knochenfische befinden sich Melanomakrophagen-Zentren, welche pigmenthaltige Zellen, Melanomakrophagen, umschließen (Agius und Roberts, 2003). Fänge und Nilsson (1985) konnten zeigen, dass die Milz der Knochenfische antikörperproduzierende Zellen enthält und somit eine wichtige Quelle für Immunglobuline ist. Die Entwicklung von Lymphozyten und B-Zellen, Antigen-Prozessierung und die Expression von MHCII Molekülen zählen zu den Hauptaufgaben der Milz (Hansen *et al.*, 2005). Eine weitere wichtige Funktion ist die Neubildung von roten Blutkörperchen nach der Zerstörung alter, verbrauchter Blutzellen (Hansen und Zapata, 1998), welche hauptsächlich in den Melanomakrophagen-Zentren stattfindet (Agius und Roberts, 2003).

Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT)

Die im Folgenden beschriebenen Gewebe stehen aufgrund ihrer exponierten Lage zur Umwelt in ständigem Kontakt zu Pathogenen und stellen mögliche Eintrittspforten für diese dar. So hat jedes dieser Gewebe eigene immunologische Strategien zur Infektionsabwehr entwickelt.

Kiemen (*gill-associated lymphoid tissue*, GIALT)

Die Kiemen im Fisch sind nicht nur respiratorisches und exkretorisches Organ sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr (Koppang *et al.*, 2010). Das ständig zur

Umwelt exponierte und somit von Mikroorganismen umgebene Gewebe verhindert, wie auch Haut und Darm der Fische, als eine der ersten mechanischen und physiologischen Barrieren ein Eindringen von Erregern in die Blutbahn (Press und Evensen, 1999). Die Kiemen der Knochenfische sind mit einer dünnen Mukusschicht bedeckt und bestehen aus vier Kiemenbogen-Paaren auf jeder Seite, bestehend aus Kiemenfilamenten, die wiederum unterteilt werden in Kiemenlamellen. Diese Oberflächenvergrößerung dient in erster Linie der Sauerstoffaufnahme aus dem Wasser bzw. Abgabe ins Blut. Im Filament-Epithel befinden sich viele Mitochondrien, Chloridzellen und Mukozyten (Wilson und Laurent, 2002). Neben weiteren Aufgaben wie der Osmoregulation, Stickstoff-Exkretion und Hormonproduktion (Evans *et al.*, 2005) sind die Kiemen aber auch an der Immunabwehr beteiligt. Eine Reihe von Immunzellen wie Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Antikörper-sezernierende Zellen wurden bereits im Kiemen-assoziierten lymphatischen Gewebe (GIALT) identifiziert, erstmals beschrieben im Atlantischen Lachs von Haugarvoll *et al.* (2008) und zusammengefasst von Salinas *et al.* (2011). Vor allem im Epithelbereich der Lamellen, der in direktem Kontakt mit dem Blutstrom steht, befindet sich eine Häufung von Lymphozyten (Monteiro *et al.*, 2010). Neben der diffusen Ansammlung von Leukozyten im Lamellen-Epithel existieren organisierte lymphatische Regionen zwischen den Kiemenbögen. Diese werden als interbranchiales lymphatisches Gewebe (*interbranchial lymphoid tissue*, ILT) bezeichnet und 2010 von Koppang *et al.* beschrieben. Die zelluläre Organisation entspricht der des Thymus, wobei der Hauptteil aus T-Zellen besteht. Die Immunkompetenz der Kiemen des Welses wurde bereits von Zhou *et al.* (2012) gezeigt, in deren Studie eine Aufregulation von Genen des alternativen Komplementwegs (*CFB*, *CFD*) nach bakterieller Infektion gezeigt werden konnte. Im Kiemengewebe der Regenbogenforelle wurde nach einer *A. salmonicida*-Infektion eine schnelle und lang andauernde Expression des *Inducible nitric oxide synthase*-Gens (*iNOS*) detektiert. Interessanterweise zeigten ebenfalls untersuchte Leukozyten aus dem Blut keine solche erhöhte Expression, was auf eine spezialisierte Funktion der Kiemen hinsichtlich dieser Immunreaktion hindeuten könnte (Campos-Perez *et al.*, 2000).

Haut (*skin-associated lymphoid tissue*, SALT)

Neben den Epithelzellen besteht die Haut der Fische aus sekretorischen Zellen, die die schützende Mukosa bilden bzw. Mukus sezernieren. Regenbogenforellen haben eine dicke Epidermis und eine hohe Protease- und Lysozymaktivität (Fast *et al.*, 2002). In der Haut der

Fische befindliche malpighische Zellen und Becherzellen sind in der Lage Phagozytose zu betreiben (Iger und Abraham, 1990; Asbakk, 2001). Faktoren des unspezifischen Immunsystems scheinen die Mukosa zu dominieren, aber in den Becherzellen von Regenbogenforellen wurden auch IgM-Antikörper nachgewiesen (Peleteiro und Richards, 1988).

Darm (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT)

Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe der Knochenfische ist diffuser als das der Säuger und unterscheidet sich völlig in Morphologie und Funktion. Die sog. Peyer-Plaques (Ansammlungen von Lymphfollikeln), mesenterische Lymphknoten, sekretorisches IgA und antigen-transportierende M-Zellen (spezialisierte Epithelzellen) fehlen im Darm der Fische (Buddington *et al.*, 1997). Eine *Lamina propria* (Schicht aus Bindegewebe) und das IEL-Kompartiment (Oberflächenepithel mit Lymphozyten) sind aber vorhanden. Die Immunzellen der *Lamina Propria* sind Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen, das IEL-kompartiment besteht hauptsächlich aus T-Zellen und einigen B-Zellen. Salinas *et al.* (2011) und Zhang *et al.* (2011) konnten die neue AK-Klasse IgT im Darm der Fische identifizieren.

Leber

Die Parenchymzellen der Leber synthetisieren und sezernieren fast alle der über 100 verschiedenen Plasmaproteine der Vertebraten (Putnam, 1985). Nach einer Infektion oder Gewebeschädigung kommt es, angeregt durch Zytokine, zur Ausschüttung wichtiger Moleküle, wozu vor allem Faktoren des angeborenen Immunsystems, wie Akute-Phase-Proteine, lytische Enzyme sowie Faktoren der Koagulationskaskade gehören (Bayne *et al.*, 2001). Vor allem aber für Faktoren des Komplementsystems gilt die Leber im Säuger als Hauptsyntheseorgan (Carroll, 2004).

1.1.3 Das Komplementsystem - ein Überblick

Das Komplementsystem gehört zu den wichtigsten Aktivierungs-Kaskaden der ersten Verteidigungslinie des angeborenen Immunsystems in Vertebraten und den meisten Invertebraten. Es agiert als einer der ersten Abwehrmechanismen im Falle einer Infektion. Es besteht aus ca. 30 verschiedenen Plasma- und Membranproteinen, welche innerhalb von drei C3-Wegen, dem terminalen Weg sowie als Rezeptoren und Regulatoren agieren (Abbildung 1).

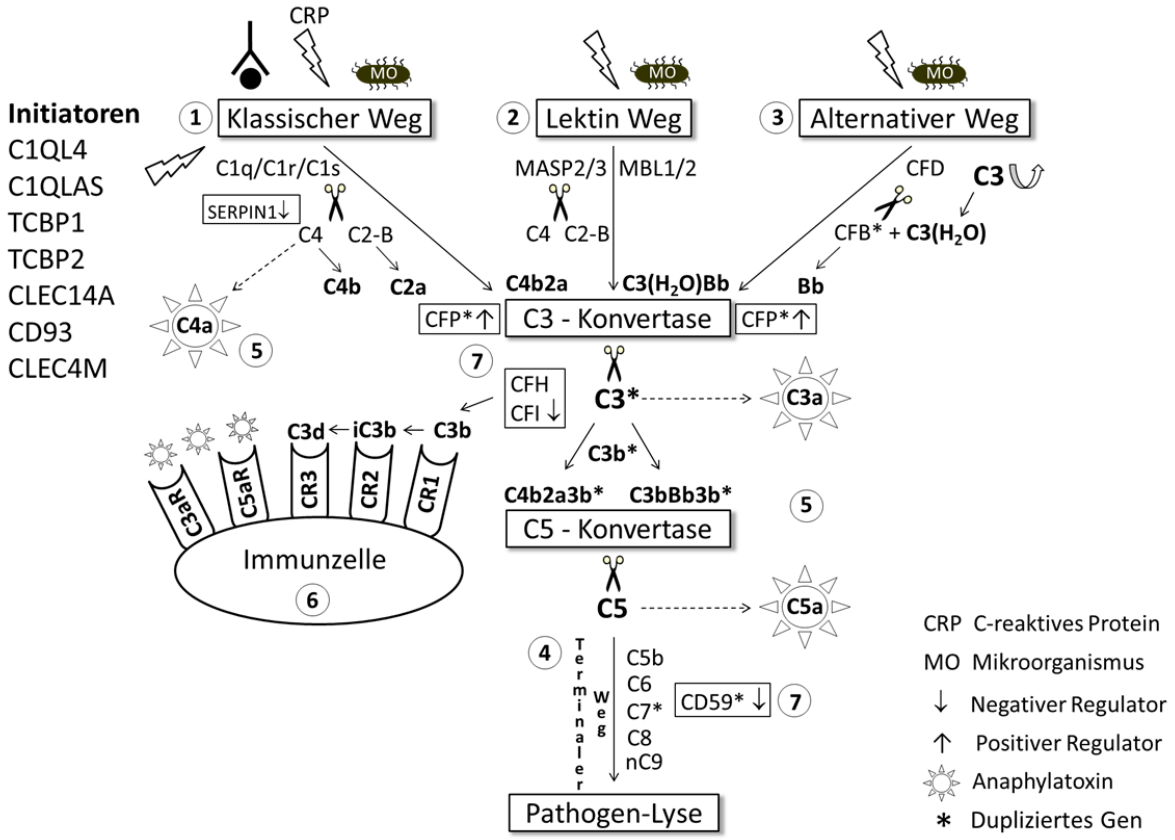

Abbildung 1 Aktivierungsschema des Komplementsystems der Regenbogenforelle.
Die durch Zahlen gekennzeichneten Abschnitte sind in nachfolgenden Textabschnitten erklärt.

Zu den wichtigsten Aufgaben des Komplementsystems gehören die Opsonisierung von Pathogenen, die Förderung inflammatorischer Prozesse und die Lyse von Bakterien. Ausgelöst wird das Komplementsystem entweder direkt durch pathogene Oberflächen (Bakterien, Viren, Pilze) oder durch Antigen-Antikörper-Komplexe, womit es auch eine Rolle im adaptiven Immunsystem spielt (Le Friec und Kemper, 2009). Ziel der drei Wege ist stets die Bildung einer sogenannten C3-Konvertase, ein proteolytischer Enzymkomplex, der einen Amplifikations-*Loop* durch die Spaltung weiterer C3-Moleküle bewirkt und durch die Spaltung von C5 eine Pathogen-Lyse über den terminalen Weg einleitet. Eine Reihe von Spaltprodukten, die innerhalb der verschiedenen Aktivierungswege entstehen (Anaphylatoxine) tragen ergänzend zur Förderung inflammatorischer Prozesse bei. Inzwischen ist klar, dass alle im Säuger vorhandenen Faktoren auch im Fisch vorhanden sind (Nakao *et al.*, 2011).

1.1.3.1 Die Evolution des Komplementsystems

Das Komplementsystem existiert bereits in Vertretern der *Cnidaria* (Dishaw *et al.*, 2005; Kimura *et al.*, 2009), die zu den primitivsten Metazoen überhaupt gehören. Nicht nur in Deuterostomiern, sondern auch in einigen Vertretern der Protostomier wie dem Pfeilschwanzkrebs und Mollusken (Castillo *et al.*, 2009) wurden Komplementkomponenten identifiziert. Somit sind Komplementgene in allen Bereichen des Tierreichs zu finden. Allerdings scheint in diesen Organsimen hauptsächlich die C3-Komponente im Lektin- und alternativen Weg vorhanden zu sein. Der klassische Weg, der auf Antigen-/Antikörperkomplex-Bildung beruht, so wie das adaptive Immunsystem existieren jedoch erst ab den Knochen- und Knorpelfischen, die zu den Kiefermäulern (*Gnathostomata*) gehören (Kaneta, 2009). Auch der terminale Weg, der zur Zytolyse führt, ist in den Invertebraten noch nicht vorhanden und hat sich vermutlich gemeinsam mit dem klassischen Weg entwickelt (Farries und Atkinson, 1991). Man nimmt an, dass das Komplementsystem vor über 1 Mrd. Jahren entstand (Nonaka und Kimura, 2006).

1.1.3.2 Funktionseinheiten des Komplementsystems

Initiatoren

Das Komplementsystem kann entweder direkt durch Bestandteile pathogener Oberflächen, Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch Akute-Phase-Proteine (APP) ausgelöst werden. Noch wenig oder gar nicht in der Regenbogenforelle beschriebene APPs sind das *trout C-polysaccharide binding proteins* 1 und 2 (TCBP1, TCBP2), die allerdings strukturell keine Ähnlichkeit haben. TCBP1 ist ein Analog des C-reaktiven Proteins (CRP, Pentraxin), einem stark konservierten APP der Vertebraten und einiger Invertebraten. Solche Proteine bestehen aus fünf identischen, kreisrund angeordneten Protomeren und werden z.B. nach einer Infektion binnen weniger Stunden stark aufreguliert (Black *et al.*, 2004). Eine ihrer Eigenschaften ist das direkte Binden pathogener Oberflächen wodurch der klassische Weg des Komplementsystems direkt ausgelöst werden kann (Nauta *et al.*, 2003). Murata *et al.* (1995) identifizierten in ihrer Studie erstmals TCBP1 als Kohlenhydrat-bindendes Protein. Bayne *et al.* (2001) erweiterten die Aminosäuresequenz und hypothetisierten eine Funktion als CRP. Weitere Hinweise auf eine Rolle als APP bzw. immunrelevantes Molekül lieferten Teles *et al.* (2011). Das ebenfalls von Murata *et al.* (1995) entdeckte TCBP2 hingegen ist ein echtes Pentraxin, welches in der Lage ist LPS von *A. salmonicida* zu binden (Hoover *et al.*, 1998).

Auch Lektine, wie das Mannose-Bindende-Lektin (MBL) oder Fikolin, sind wirksame Komponenten des angeborenen Immunsystems, um fremde Strukturen erkennen und bekämpfen zu können (Turner, 1996). Diese Proteine gehören zu den Kollektinen mit einer Kollagen-ähnlichen Domäne und einer Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (Holmskov *et al.*, 1994). Ein ebenfalls zu den Lektinen gehörendes Protein ist CLEC4M, welches eine C-Typ-Lektin-*like*-Domäne (CTLD) besitzt, durch welche eine Kalzium-abhängige Kohlenhydratbindung ermöglicht wird. Auch ihnen wird eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem, wie bspw. die Aktivierung des Komplementsystems, zugesprochen (Holmskov *et al.*, 1994; Vasta *et al.*, 2011).

C1q ist eine Untereinheit (UE) des C1-Komplexes des klassischen Komplementwegs. Dieses Molekül, welches wie MBL ebenfalls zu den Kollektinen gehört, hat eine globuläre Kopfdomäne, mit welcher eine Reihe verschiedenster Liganden erkannt werden kann. In den letzten Jahren wurden immer mehr Proteine entdeckt, die ebenfalls eine C1q-ähnliche, globuläre Domäne und eine TNF-ähnliche Domäne besitzen und innerhalb der ‚C1q und TNF Superfamilie' zusammengefasst werden (Nayak *et al.*, 2012). Auch diese Moleküle könnten eine Rolle bei der Aktivierung des Komplementsystems spielen.

Der klassische Weg (1)

Der klassische Weg kann zum einen über Antigen-Antikörper-Komplexe ausgelöst werden, wobei der FC-Teil des Antikörpers (*crystallisable fragment*, schwere Kette) mit der globulären Kopfregion einer Untereinheit das C1-Komplexes, C1q, interagiert (Kishore *et al.*, 2002). Aber auch Bestandteile pathogener Oberflächen oder Akute-Phase-Proteine wie TCBP1 (CRP-Analog) konnten als Aktivatoren identifiziert werden (Carroll, 2004; Garlanda *et al.*, 2005). Dadurch werden die an den Kollagenteil gekoppelten Serinproteasen C1r und C1s aktiviert. Die nächste Komponente der Kaskade ist C4, welche von C1s in C4a und C4b gespalten wird (Holland und Lambris, 2002). Über eine nun freigelegte Thioesterbindung von C4b kann dieses auf einer pathogenen Oberfläche binden. Darauffolgend wird eine weitere Komponente, C2, ebenfalls von C1s geschnitten. C2a bindet dann an C4b, wobei beide die C3-Konvertase des klassischen Wegs, C4b2a, bilden. Dieser Enzymkomplex, mit C2a als proteolytischer Untereinheit, spaltet daraufhin native C3-Komponenten, wobei sich anschließend durch die Anlagerung von C3b, die C5-Konvertase des klassischen Wegs, C4b2a3b, bildet (Pangburn und Rawal, 2002). Eine Besonderheit im klassischen Weg bei der Regenbogenforelle ist die Existenz von drei C3-

Isotypen, C3-1, C3-3 und C3-4. Für die jeweiligen Spaltprodukte wurden bereits verschiedene Bindeeigenschaften für Bestandteile in pathogenen Oberflächen nachgewiesen und eine dadurch erhöhte Diversität des Komplementsystems hypothetisiert (Zarkadis *et al.*, 2001). Die von Nonaka *et al.* (1985) beschriebene „zweite" C3-Komponente, C3-2, erwies sich als nicht funktional im klassischen Weg und eine Sequenz dieses Moleküls ist nicht verfügbar. Weitere Analysen dazu fehlen gänzlich.
Wie auch im Zebrabärbling und Japanischen Reisfisch existiert in der Regenbogenforelle nur ein C2-Molekül (C2-B), welches eine ähnliche Sequenz zu C2 und auch zu CFB (des alternativen Wegs) im Säuger zeigt. Welche genaue Rolle dieses Molekül spielt, ist aber noch nicht geklärt (Sunyer *et al.*, 1998).

Der Lektin-Weg (2)

Ausgelöst wird der Lektin-Weg durch die Interaktion von MBL oder Fikolin, zwei sog. *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs), mit Kohlenhydraten pathogener Oberflächen (z.B. Mannose). Wie im Säuger existieren auch im Fisch zwei MBL-Moleküle (Nikolakopoulou und Zarkadis, 2006). Wie beim C1-Komplex des klassischen Wegs sind auch hier Serinproteasen, die MASPs (MBL-assoziierte Serinproteasen), an den Kollagenteil gekoppelt, die nach erfolgter Bindung C4 und C2, wie im klassischen Weg, spalten (Fujita *et al.*, 2004). Die MASPs sind homolog zu C1r und C1s des klassischen Wegs (Sim und Laich, 2000). MASP1, 2 und 3 sind bisher im Säuger bekannt und alle drei sind mit MBL und Fikolin assoziiert (Gal und Ambrus, 2001). MASP1 und MASP2 scheinen im Säuger für die Spaltung von C4 und/oder C2 verantwortlich zu sein (Hajela *et al.*, 2002). Die Rolle von MASP1 ist noch unklar, da diese nicht in der Lage ist C4 oder C2 zu spalten (Zundel *et al.*, 2004). Allerdings wurde bisher lediglich ein MASP1-ähnliches Molekül im Zebrabärbling identifiziert. MASP3 hingegen scheint MASP2 zu inhibieren (Sunyer *et al.*, 2003).

Der alternative Weg (3)

Die Aktivierung des alternativen Wegs basiert zunächst auf der spontanen Hydrolyse von C3, wobei ein C3b-ähnliches Molekül ($C3(H_2O)$) entsteht. Dieses kann mit Hydroxyl-oder Aminogruppen pathogener Oberflächen, wenn diese in der Nähe sind, reagieren und so kovalent an diese binden (Law *et al.*, 1979; Law und Dodds, 1997). Anschließend kann CFB an C3b binden, wodurch CFB von der Serinprotease CFD geschnitten werden kann. Das dadurch

entstandene Fragment Bb bildet daraufhin die proteolytische Untereinheit der C3-Konvertase des alternativen Wegs C3(H_2O)Bb (Xu *et al.*, 2001). Dieser Enzymkomplex kann nun, wie auch die C3-Konvertase des klassischen und Lektin-Wegs, weitere C3-Moleküle spalten. In der Regenbogenforelle existieren nicht nur drei C3-Moleküle, sondern auch zwei CFB-Moleküle, die vermutlich durch die salmonidenspezifische Genomduplikation entstanden sind. Das Besondere ist, dass CFB2 wahrscheinlich auch innerhalb des klassischen Wegs als proteolytische Untereinheit der C3-Konvertase agieren kann (Sunyer *et al.*, 1998).

Der terminale Weg (4)

Der terminale, oder zytolytische Weg führt, durch die Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC), letztendlich zur Pathogenlyse. Ausgehend von dem Spaltprodukt C5b, entstanden durch die Spaltung von C5 durch die C5-Konvertasen, lagern sich weitere Komplementkomponenten, C6, C7 und C8, auf einer pathogenen Oberfläche an. Zum Schluss erfolgt die Anlagerung mehrerer C9-Moleküle, wodurch schließlich eine Pore entsteht (Esser, 1994). Diese sorgt dann für einen osmotischen Einstrom von Wasser wodurch die Zielzelle platzt (Duncan und Morgan, 2003). Auch eine Verbindung zur Apoptose wurde postuliert (Nauta *et al.*, 2002), wobei gezeigt wurde, dass der C5b-9-Komplex an einer Kaspase-abhängigen Aktivierung des programmierten Zelltods beteiligt ist.

Anaphylatoxine (5)

Anaphylatoxine sind die Spaltprodukte C3a, C4a und C5a, welche während der Aktivierungsreaktionen des klassischen-, Lektin- und alternativen Wegs entstehen.

C5a spielt vermutlich die wichtigste Rolle als proinflammatorisches Molekül (Kohl, 2001). Boshra *et al.*, (2004) zeigten in ihrer Studie, dass C5a in der Regenbogenforelle bei der Migration von Leukozyten und der Induktion von oxidativem *Burst* peripherer Blutlymphozyten und Leukozyten der Kopfniere bewirkt, wodurch es zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies kommt. Außerdem induziert es eine Histaminausschüttung aus den Mastzellen, um die Gefäße für andere Immunfaktoren durchlässiger zu machen (Frank und Fries, 1991).

Ein weiteres Anaphylatoxin, C3a, vermittelt durch die Bindung an den C3a-Rezeptor die Chemotaxis von Eosinophilen und Mastzellen und stimuliert ebenfalls oxidativen *Burst* in Leukozyten. Aufgrund der drei C3-Isotypen in der Regenbogenforelle existieren auch drei C3a-Moleküle, die von Rotllant *et al.* (2004) charakterisiert und als funktional bestätigt wurden. Jedes

der drei Moleküle ist in der Lage, in unterschiedlicher Stärke respiratorischen *Burst* von Kopfnieren-Leukozyten zu stimulieren.
C4a erfüllt ähnliche Aufgaben wie C5a und C3a, wurde aber in der Regenbogenforelle noch nicht charakterisiert. Allerdings ist es das schwächste und am wenigsten relevante und auch am wenigsten charakterisierte Anaphylatoxin im Säuger (Frank und Fries, 1991).

Rezeptoren (6)

Die initialen Studien von Fujiki *et al.* (2003), Boshra *et al.* (2004) sowie Holland und Lambris (2004) bestätigten erstmals die Existenz eines funktionalen C5a-Rezeptors für das Anaphylatoxin C5a und seine Expression auf B-Lymphozyten der Regenbogenforelle. Der Rezeptor scheint dem der Säuger funktional sehr ähnlich zu sein. Dieser wird auch in der Regenbogenforelle hauptsächlich auf Leukozyten wie Granulozyten, Makrophagen und Monozyten exprimiert und ist nach dem Binden von C5a für deren Chemotaxis verantwortlich.
Auch der C3a-Rezeptor wurde kurze Zeit später in der Regenbogenforelle identifiziert und untersucht (Boshra *et al.*, 2005). Dieser zeigt eine hohe Homologie zum C5a-Rezeptor weshalb ein gemeinsames Vorläufer-Gen vermutet wird. Diesem Rezeptor fehlt ein großer Teil eines extrazellulären *Loop*s im Vergleich zum Säuger-Homolog. Eine Interaktion mit C3a wurde dennoch nachgewiesen. C3aR scheint in der Regenbogenforelle hauptsächlich auf peripheren Blutleukozyten und B-Lymphozyten exprimiert zu sein.
Ebenfalls in der Regenbogenforelle bekannt ist der Komplementrezeptor CR3, welcher kürzlich von Mikrou *et al.* (2009) charakterisiert wurde. Dieser erkennt das inaktivierte Spaltprodukt iC3b und befindet sich hauptsächlich auf Monozyten und Neutrophilen (Yakubenko *et al.*, 2002). Die Rezeptoren CR1, CR2 und CR4 wurden noch nicht in der Regenbogenforelle charakterisiert. Der CR1-Rezeptor im Säuger wird auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert und erkennt C3b- und C4b-opsonisierte Partikel (Gigli und Nelson, 1968; Klickstein *et al.*, 1987). CR2, exprimiert auf B-Lymphozyten, erkennt die inaktivierten Spaltprodukte iC3b und C3d (Clemenza und Isenman, 2000; Molina, 2004). Auch CR4 erkennt und bindet iC3b. Diese Rezeptoren dienen als Schaltstelle zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem.

Regulatoren (7)

Das Komplementsystem unterliegt einer strengen Regulation, um einen Angriff körpereigener Zellen und entsprechende pathologische Konsequenzen zu verhindern (Lukacik *et al.*, 2004).

Deshalb existieren Regulator-Moleküle, die die wichtigsten Aktivierungsstellen überwachen. In der Regenbogenforelle bekannt sind die negativen Regulatoren SERPIN1, CFI, CFH und CD59. Auch der positive Regulator CFP wurde bereits identifiziert.

SERPIN1, der C1-Inhibitor, interagiert mit den C1-assoziierten Serinproteasen C1r und C1s (Oltvai *et al.*, 1991) sowie MASP1 und MASP2 (Matsushita *et al.*, 2000), um eine Autoaktivierung des klassischen und des Lektin-Wegs zu verhindern (Davis *et al.*, 2010). Auch ein hemmender Einfluss auf den alternativen Weg durch das Blockieren von C3b wurde gezeigt (Jiang *et al.*, 2001).

Der Komplementfaktor I (CFI) ist für die Fragmentierung von freiem C3b in iC3b und C3d verantwortlich (Harrison, 1980). Einer der Ko-Faktoren dieser Reaktion ist der Faktor H (CFH). Auch C4b wird auf diese Weise inaktiviert. Dieser kann auch die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Wegs hemmen, indem dieser C3b bindet und somit die Interaktion mit CFB verhindert (Weiler *et al.*, 1976).

Der negative Regulator des terminalen Wegs CD59 ist in der Regenbogenforelle zweimal vorhanden und durch dupliziert vorliegende Gene kodiert (Papanastasiou *et al.*, 2007). CD59 hemmt die Anlagerung der C9-Moleküle an den C5b-C8-Komplex und verhindert somit die Bildung des Membran-Angriffs-Komplexes (Rollins und Sims, 1990).

Der einzige bekannte positive Regulator des Komplementsystems ist Properdin (CFP), ein Faktor der dreimal, als CFP1, 2 und 3, in der Regenbogenforelle vorhanden ist (Chondrou *et al.*, 2008). CFP stabilisiert die C3-Konvertase des alternativen Wegs und erhöht somit die Effektivität der Bekämpfung von Pathogenen über den alternativen Weg (Pillemer *et al.*, 1954).

2. ZIELSETZUNG

Die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit sollen einen Wissensbeitrag zur Aufklärung des Immunsystems der Regenbogenforelle leisten. Experimentelle Voruntersuchungen an der regionalen Langzeitselektionslinie Stamm BORN zeigten gegenüber auf das Merkmal Wachstum gezüchteten handelsüblichen Importforellen des Stamms TCO eine deutlich erhöhte Überlebensfähigkeit wenige Tage nach intraperitonealer Einwirkung des Fischpathogens *A. salmonicida.* Es wurde deshalb die Hypothese überprüft, ob möglicherweise eine ungleiche Reaktivität des angeborenen Immunsystems eine der Ursachen für die beobachtete differente Mortalität zwischen den Forellenlinien darstellt. Das Hauptziel dieser Arbeit bestand deshalb zunächst darin, immunrelevante Gene zu identifizieren, die den Gesundheitsstatus im Forellenstamm BORN aufrechterhalten und an frühen, angeborenen Abwehrmechanismen beteiligt sind. Dazu sollte eine vergleichende holistische Transkriptomanalyse zwischen Milzgewebe gesunder Regenbogenforellen des handelsüblichen Importstamms TCO und des Stamms BORN durchgeführt werden. Die Milz vereint als wichtigstes sekundäres Lymphorgan der Knochenfische sowohl die im Fokus der Untersuchungen stehenden angeborenen, aber auch adaptive Immunfunktionen und eignet sich daher besonders für die Identifizierung immunrelevanter Kandidatengene.

Weiterhin sollten different exprimierte, immunrelevante Gene sowie mit diesen vernetzte Gene strukturell und funktional in der Milz, den Kiemen und der Leber charakterisiert werden. Dazu zählen phylogenetische Untersuchungen der hypothetischen Proteine, die Charakterisierung funktioneller Domänen und Motive sowie die Erfassung von Genexpressionsdaten in den Geweben gesunder Tiere.

Neben der Milz fokussierten die Analysen der vorliegenden Arbeit auf die Kiemen, da diese hinsichtlich ihrer Immunkompetenz bisher kaum untersucht wurden. Aufgrund der zur Umwelt exponierten Anatomie und mukosal assoziierter Leukozyten ist aber eine Beteiligung an einer Immunabwehr anzunehmen, welche im Verlauf einer Infektion mit *A. salmonicida* überprüft werden sollte. Aufgrund einer zusätzlichen salmonidenspezifischen Genomduplikation sind viele Genkopien in der Regenbogenforelle vorhanden, weshalb auch vergleichende Expressionsstudien duplizierter Gene Beachtung finden sollten. Begleitend zu *in vivo*-Experimenten sollte die Zelllinie RTgill-W1 hinsichtlich ihrer Kompetenz zur Aktivierung von Komplementgenen und Eignung für die Nachstellung von Stressexperimenten *in vitro* überprüft werden.

3. MATERIAL & METHODEN

3.1 Material

Eine genaue Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Medien, Geräte, molekularbiologische Kits, Oligonukleotide sowie Hard-und Software ist im Anhang unter A zu finden.

3.1.1 Regenbogenforellen des Stamms TCO

Bei den Regenbogenforellen des Stamms TCO handelt es sich um in erster Linie auf das Merkmal Wachstum selektierte Importforellen. Die Stammbezeichnung TCO erfolgte willkürlich für diese Arbeit und stellt keinen Handelsnamen dar. Die Forellen wurden aus rein weiblichen, sterilen Augenpunkt-Eiern der Firma Troutlodge ansässig in Tacoma (USA) in der Teichwirtschaft Frauenmark der BIMES Schwerin GmbH großgezogen. Die Elterntiere entstammen ursprünglich anadromen *Steelhead*-Forellenstämmen des nordwestlichen Pazifik und wurden mit einem genetischen Selektionsprogramm hinsichtlich ihres Wachstums, aber auch hinsichtlich der Schlüpfrate und Futterverwertung in der Süßwasseraquakulturhaltung optimiert (*Troutlodge's genetic selection program*, http://www.troutlodge.com/). Die Sterilität der Nachkommen dieser Fische zieht einige für die Aufzucht positive Effekte nach sich. Aufgrund der Nichtausbildung von Gonaden bleibt mehr Energie für besseres Wachstum und eine verbesserte Fleischqualität. Zudem ist eine Kreuzung mit natürlichen Populationen nicht möglich und einer ungewollten Einwanderung der Regenbogenforelle in Exportregionen wird vorgebeugt.

3.1.2 Regenbogenforellen des Stamms BORN

Die Züchtung der Regenbogenforellen des Stamms BORN wurde 1975 am Institut für Fischerei in Born (LfA-MV) im Brackwasser des Barther Boddens aus *Steelhead*-Forellen aus Dänemark begonnen, durch natürliche Selektion auf das Merkmal „Überleben ohne therapeutische Hilfe“ (Anders, 1986). Die Fische zeichneten sich durch eine hohe Wachstumsleistung und gute Futterverwertung aus. Das Brackwasser in den Boddenrandgewässern der südwestlichen Ostsee ist gekennzeichnet durch starke Schwankungen von Temperatur (-0.3-28°C), Salzgehalt (2.5-6 PSU), pH-Werten (6.5-8), Sauerstoffgehalt sowie starke Eutrophierung und hohe Pathogendichte und stellt somit einen für Regenbogenforellen besonders schwierigen Lebensraum dar. Die Auswahlkriterien der Ausgangstiere für die Verwendung als Laichfisch waren das Überleben

ohne therapeutische Hilfe und eine positive Massenauslese, wobei Kümmerlinge und verkrüppelte Fische aussortiert wurden. Das Ergebnis waren Tiere, die geringere Verluste aufwiesen als von außen neu zugeführtes Tiermaterial. Die Langzeitselektion führte zu einer generell höheren Robustheit der nun als Stamm BORN bezeichneten Selektionslinie.

3.1.3 Organe der Regenbogenforellen

Zweijährige, in der brackwassergespeisten Aquakulturanlage Born des Fischereiinstitutes der LFA M-V aufgezogene Regenbogenforellen des Stamms BORN wurden vor Versuchsbeginn in die Teichanlage Frauenmark (BIMES, MV) überführt, an die Süßwasserbedingungen adaptiert und bis zur Beprobung dort gehalten. In einem direkt daneben befindlichen Teich befanden sich ebenfalls zweijährige Forellen des Stamms TCO, die bereits nach der Anzucht bis auf Fingerlinggröße aus Born in die Teichanlage Frauenmark überführt wurden. Nach einer 14-tägigen Adaptation der BORN-Forellen an die Bedingungen der Teichanlage erfolgte die parallele Beprobung beider Stämme.
In Vorbereitung auf das Infektionsexperiment wurden TCO- und BORN-Forellen gleichzeitig bis zum Fingerlingstadium in süßwassergefüllten Aufzuchtbehältern herangezogen und an Süßwasserbecken adaptiert. Anschließend wurden insgesamt je 100 Forellen im Alter von 11-12 Monaten gleichmäßig auf vier Süßwasseraquarien (300 L, 15°C) aufgeteilt.

Zur Durchführung geplanter Microarray-Experimente und Expressionsanalysen wurden aus gesunden Tieren die Organe Milz, Kiemen und Leber präpariert und für die weitere Aufarbeitung in Flüssigstickstoff oder RNAlater eingelagert.

3.1.4 Bakterienstämme und Zelllinen

Escherichia coli Stamm XL1-Blue MRF´	Stratagene, La Jolla, USA
Aeromonas salmonicida subsp. *salmonicida*-Wildtyp-Stamm JF 2267	Microbank™, Pro-Lab Diagnostics, Cheshire, UK
RTgill-W1 (ATCC® CRL-2523™),	American Type Culture Collection, Manassas, USA

3.1.5 Antikörper

anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim

3.1.6 Vektoren

pGEM®-T-Vektor-System Promega, Mannheim

3.1.7 Längenstandards

Beide Längenstandards stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Für die Größenbestimmung von RNA wurde der Längenstandard *RiboRuler High Range RNA Ladder* verwendet (200 bis 6000 bp) (Abbildung 2A). Die DNA-Größenbestimmungen erfolgte mit dem *FastRuler Low Range DNA Ladder* (50 bis 1500 bp) (Abbildung 2B).

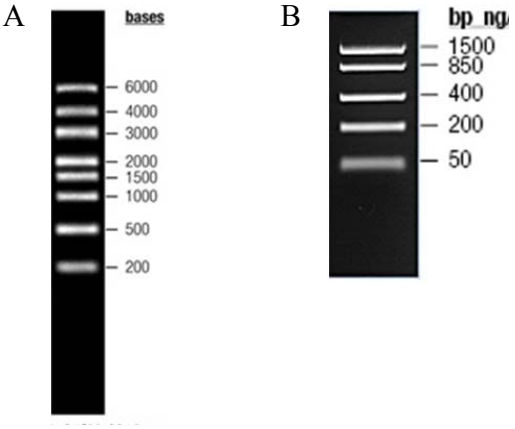

Abbildung 2 Verwendete Längenstandards.
A RiboRuler High Range RNA Ladder **B** FastRuler Low Range DNA Ladder

3.2 Methoden

3.2.1 Organpräparation aus Regenbogenforellen

Nach Tötung der Forellen wurden die Fische umgehend vom Darm her geöffnet und Milz, Kiemen, Leber und Kopfniere für Analysen entnommen. Die Organe wurden gewogen und anschließend in RNAlater konserviert.

RNAlater

Natriumcitrat	3.63 g
EDTA	1.85 g
Ammoniumsulfat	350 g
DEPC-H_2O	500 ml

3.2.2 Isolierung von DNA aus Forellen-Gewebe

Zur Isolierung von DNA aus den präparierten Geweben wurde das *DNeasy Blood & Tissue Kit* von Qiagen (Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Die DNA wurde in 50 µl H_2O aufgenommen und die Konzentration anschließend am *NanoDrop*™ 1000 (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) bestimmt.

3.2.3 Herstellung einer DNA-Bank mittels GenomeWalker™ DNA walking

Für die Analyse von Promotorstrukturen und Introns ist es notwendig DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dazu wurde eine DNA-Bank mit Hilfe des *GenomeWalker™ Universal Kits* (Clontech, Heidelberg) hergestellt. DNA aus der Regenbogenforelle wurde mit Hilfe der vier Restriktionsenzyme *Eco*RI, *Dra*I, *Pvu*II und *Stu*I geschnitten. An die verschieden langen DNA-Fragmente wurden sog. Adapter ligiert, von denen ausgehend in einer anschließenden PCR mit einem genspezifischen Primer genomische Fragmente amplifiziert werden konnten.

3.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Forellengewebe

Mehrere Organstückchen wurden in gefrorenem Zustand in Flüssigstickstoff pulvrig fein gemörsert und in eine 2-ml-Mikroröhre überführt. Dazu wurden je sechs Precellys-Keramik-Kügelchen (Ø 2.8 mm) (Peqlab Biotechnologie) und 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden anschließend zweimal bei 500 rpm im Homogenisator Precellys 24 (Peqlab Biotechnologie) aufgeschlossen. Ein 5-minütiger Schritt auf Eis schloss sich an. Auf die gekühlte Suspension wurde 200 µl Chloroform gegeben, mehrfach invertiert und anschließend für 3 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm und 4°C wurden Zelldebris und Proteine von der wässrigen Phase getrennt. Die ausgeschüttelten Ribonukleinsäuren wurden anschließend mit der wässrigen Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl Isopropanol zugegeben. Es wurde 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml gekühltem 70%-igem Ethanol für 5 min bei 14000 rpm und 4°C gewaschen. Die Nukleinsäuren wurden nach kurzer Trocknung in 100 µl DEPC (Diethyldicarbonat)-H_2O, zur Inaktivierung von RNasen, aufgenommen. Zur weiteren Aufreinigung und Entfernung restlicher genomischer DNA wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Nach der Eluierung der RNA mit DEPC-H_2O erfolgte die Konzentrationsbestimmung am *NanoDrop*™ 1000.

DEPC-H_2O

Diethylpyrocarbonat	10 ml
H_2O	1 L

Qualitäts- und Quantitätsprüfung von RNA

Zur Überprüfung der Qualität der erhaltenen RNA wurden 1 µl RNA und 2 µl RNA-Marker (Thermo Fisher Scientific) mit RNase-freiem DEPC-H_2O auf 10 µl aufgefüllt und mit 2 µl selbst hergestelltem Ladepuffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 70°C wurde die RNA und 2 µl des RNA Markers auf einem 1%-igem Agarosegel elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 100V in 0.5 x TBE-Puffer aufgetrennt (Abbildung 3). Die Visualisierung der RNA erfolgte durch das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid (2.5% (v/v)) bei UV-Licht.

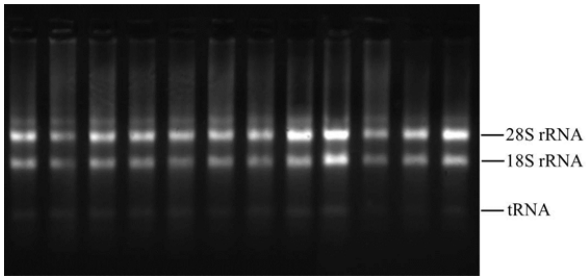

Abbildung 3 Auftrennung von Gesamt-RNA aus Milzgewebe von 12 TCO-Forellen zur Qualitätsprüfung.

1% Agarosegel

0.5 x TBE	75 ml
Agarose	0.75 g

Ladepuffer

87% Glycerin	50%
Bromphenolblau	0.1%
0.5 M EDTA	120 mM
1 M Tris/HCl pH 8.0	10 mM

1 M Tris/HCl, pH 8.0

Tris	121.14 g
HCl	42 ml

10 x TBE (Tris-Borat-EDTA)

Tris	108 g
Borsäure	55 g
0.5 M EDTA	40 ml
H_2O	1 L

0.5 M EDTA, pH 8.0

EDTA	186.1 g
NaOH	20 g
H_2O	1 L
pH mit Essigsäure einstellen	

3.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die weitere Verwendung von isolierten Nukleinsäuren war eine Konzentrationsbestimmung erforderlich. Diese erfolgte vollautomatisch mit dem *NanoDrop*™ 1000. Jede Probe wurde mind. zweimal gemessen und je 1.0 µl eingesetzt.

3.2.6 Herstellung von cDNA (copy DNA)

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA beruht auf dem Prinzip der reversen Transkription. Es wurden 5 µg RNA entsprechend auf ein Volumen von 10 µl mit DEPC-H_2O aufgefüllt. Dazu wurden 1 µl Oligo-dT-Primer und 1 µl dNTP-Mix gegeben und für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 5 x *First Strand* Puffer, 2 µl DTT und 1 µl *Super Script II Transkriptase* (*Super Script*^{TM}*II Kit*, Invitrogen) hinzu pipettiert. Die Synthese erfolgte im Thermocycler T1 (Biometra, Göttingen) für 50 min bei 42°C. Es schloss sich eine 15-minütige Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 72°C an.

Aufreinigung von cDNA

Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* von Roche (Mannheim) laut Herstellerprotokoll. Anschließend wurde die cDNA für PCR- und qRT-PCR-Analysen verwendet.

3.2.7 Microarray-Experiment zur Identifizierung different exprimierter Gene

Ein Microarray-Experiment erlaubt es, holistisch die Transkriptomaktivitäten von Organen verschiedener Tiere unter verschiedenen Bedingungen (z.B. gesunder Ausgangszustand, Temperaturstress, Infektion) miteinander zu vergleichen. Wir haben den vom ***c****onsortium for* ***G****enomic* ***R****esearch on* ***A****ll* ***S****almon* ***P****roject* (cGRASP) entwickelten 16K-Microarray verwendet, um das Milztranskriptom der Regenbogenforellenstämme TCO und BORN im gesunden Zustand zu analysieren (Abbildung 4). Der 16K-Array basiert auf 16006 cDNA-Klonen, wobei 13421 cDNAs (~ 84%) vom atlantischen Lachs (*Salmo salar*) und 2576 ESTs (~ 16%) der Regenbogenforelle (*Onchorhynchus mykiss*) verwendet wurden (von Schalburg *et al.*, 2008).

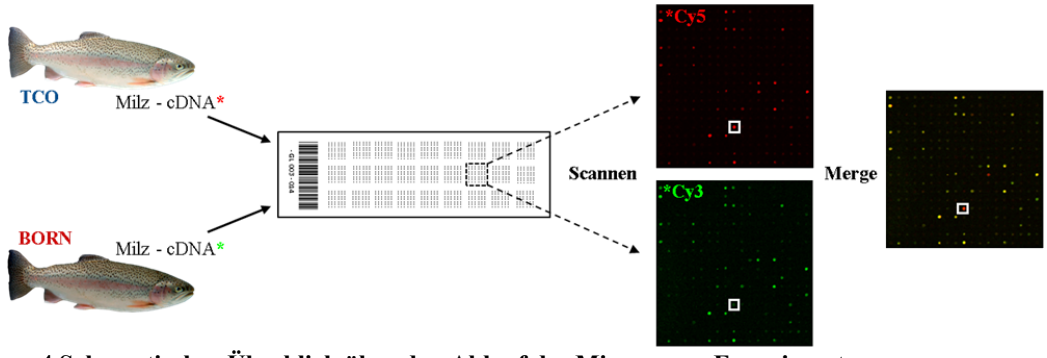

Abbildung 4 Schematischer Überblick über den Ablauf des Microarray-Experiments.

3.2.7.1 cDNA-Synthese mit 3DNA-Ankersequenz

Von insgesamt 15 klinisch gesunden Regenbogenforellen der Stämme TCO und BORN wurden Milzproben entnommen (siehe 3.2.1). Aus diesen wurde Gesamt-RNA gewonnen (siehe 3.2.4) und eine reverse Transkription durchgeführt wie unter 3.2.6 beschrieben.

Für jeden Array wurde cDNA aus fünf Forellen je Stamm zur Hybridisierung verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Binde-und Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe Cyanin 3 (Cy3) und Cyanin 5 (Cy5) wurde die cDNA beider Stämme reziprok markiert, d.h. die cDNA von TCO und BORN wurde in zwei Versuchen mit beiden Ankersequenzen für Cy3 und Cy5 synthetisiert (sogenanntes *Dye Swap*). Die Ergebnisse der beiden Arrays wurden jeweils gemittelt, um Unterschiede der Farbstoffe auszugleichen. Insgesamt wurden elf Arrays hybridisiert, wobei drei biologische Replikate erfolgten. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Herstellerprotokoll (Genisphere Array 50 (version 2)^{TM} labeling protocol) von Genisphere Inc. (Hatfield. UK) einzusehen. Für die cDNA-Synthese wurden 4 µg Gesamt-RNA, gepoolt aus jeweils fünf Tieren pro Forellenstamm, eingesetzt. Für die Herstellung von Mix 1 wurde die entsprechende Menge RNA mit H_2O auf 22 µl aufgefüllt. Dazu kam 1 µl Genisphere-Oligo-d(T)-Primer, versehen mit einer 3DNA-Ankersequenz für die Fluoreszentfarbstoffe Cy3 oder Cy5 (3DNA Array Detection, Array 50™ Kit, version 2, Genisphere Inc.). Dieser Ansatz wurde leicht gemischt, für 5-10 s bei 7 rpm in der Microfuge (MicroV, FisherScientific, Schwerte, Deutschland) zentrifugiert, für 10 min bei 80°C denaturiert und anschließend für 3 min auf Eis gekühlt. Mix 1 wurde mit der Zugabe von 1 µl RNase-Inhibitor (Superase In, Genisphere Inc.) komplettiert. Auf Eis wurde Mix 2 angesetzt, bestehend aus 8 µl SuperScript First Strand Buffer (Invitrogen), 2 µl dNTPs (Genisphere Inc.), 4 µl 0.1 M DTT (Invitrogen) und 2 µl Superscript II (Invitrogen). Auch dieser Mix wurde leicht gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde

Mix 2 zu Mix 1 gegeben (zusammen 40 µl) und leicht aber gründlich gemischt. Es erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei 42°C. Die Reaktion wurde mit 7 µl 0.5 M NaOH/50 mM EDTA (Genisphere Inc.) gestoppt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Zur Neutralisierung wurde 10 µl 1.0 M Tris/HCl, pH 7.5 (im Kit) zugegeben. Danach wurden die beiden cDNA-Ansätze der Stämme TCO und BORN in einem 1.5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt. Die zuvor verwendeten Reaktionsgefäße wurden mit jeweils 8 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1mM EDTA gespült und zum gepoolten Ansatz gegeben, sodass sich ein endgültiges Volumen von 130 µl ergab.

Konzentrierung der cDNA

Die resultierende cDNA wurde mittels des *Microcon Centrifugal Filter Device Kit* (Millipore, Billerica, USA) aufgereinigt. Der *Microcon*-Filter wurde zunächst mit 100 µl TE oder H_2O gespült und für 3 min bei 11500 rpm getrocknet. Der cDNA-Ansatz wurde auf den Filter gegeben und für 7 min bei 11500 rpm zentrifugiert. Danach wurden 5 µl 1x TE, pH8.0 auf den Filter gegeben und die Säule um 180°C gedreht, in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß platziert und für 2 min bei 11100 rpm eluiert. Es ergab sich ein Eluat von ca. 10 bis 15 µl.

3.2.7.2 Präparation der cDNA-Microarrays

Die nachfolgenden Schritte erfolgten parallel zur cDNA-Synthese. Jeweils zwei Microarrays wurden zweimal für je 5 min in 0.2% SDS gewaschen, danach fünfmal jeweils 1 min in Milli-Q-H_2O (Milli-Q Integral Water Purification System, Millipore, Billerica, USA). Das Trocknen der Microarrays erfolgte durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1575 rpm (Allegra® X-12R Benchtop, Beckman Coulter, Krefeld).

Prähybridisierung

Die Arrays wurden für 45 min in Prähybridisierungslösung (5x SSC, 0.1% SDS, 0.2% BSA) bei 49°C inkubiert. Danach wurde zweimal für je 20s in Milli-Q-H_2O gewaschen und unverzüglich für 5 min bei 1575 rpm zum Trocknen der Arrays zentrifugiert. Bis zur Hybridisierung erfolgte die Aufbewahrung der Arrays bei 49°C im Wasserbad.

cDNA-Hybridisierung

In Vorbereitung auf den Hybridisierungsmix wurde zunächst der *Genisphere 2x formamide buffer* für 10 min bei 55°C im Wasserbad aufgetaut und gut durchmischt. Der Mix bestand aus der cDNA, mit H_2O auf 26 µl aufgefüllt, 30 µl *Genisphere 2x formamide buffer* und 4 µl *LNA dT*

blocker, sodass sich ein Volumen von 60 µl ergab. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 80°C inkubiert und bis zur Verwendung bei 65°C aufbewahrt. Der Hybridisierungsmix wurde auf den vorbereiteten Microarray pipettiert und mit einem Deckglas durch leichtes Abrollen luftblasenfrei abgedeckt. Die Microarrays wurden in der Hybridisierungskammer (vier Tropfen H_2O in die Ecken geben) für 16h üN (über Nacht) bei 49°C hybridisiert.

Post-cDNA-Hybridisierung

Zunächst wurden die Deckgläser durch leichtes Rütteln der Arrays in 49°C warmer Waschlösung I (2 x SSC, 0.1% SDS+DTT, Endkonz. 0.5-1 mM) abgeschwemmt. In einer neuen Spülkammer mit ebenfalls warmer Waschlösung I (+DTT, Endkonz. 0.5-1mM) wurden die Microarrays im Wasserbad für 10 min gespült. Danach schlossen sich folgende Waschschritte an:

• 2-mal für je 5 min in Waschlösung I (+DTT, Endkonz. 0.5-1mM) bei RT
• 2-mal für 5 min in 1x SSC (+DTT, Endkonz. 0.5-1 mM)
• 2-mal für je 5 min in 0.1 x SSC

Nach dem letzten Waschschritt erfolgte der direkte Transfer der Arrays in ein 50-ml-Falkon mit Handtuchpapier im Boden zum Auffangen von Flüssigkeit. In dieser Vorrichtung wurden die Arrays für 5 min bei 1575 rpm in der Allegra® X-12R Benchtop (Beckman Coulter) trocken zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Arrays bei 49°C im Wasserbad aufbewahrt.

3DNA Array 50 Capture Reagent-Hybridisierung

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter Lichtausschluss. Zunächst wurden die Farbstoffe Cy3 und Cy5 bei RT für 20 min aufgetaut und nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren für 10 min bei 55°C inkubiert. Gleichzeitig wurde der *Genisphere 2x formamide buffer* für 10 min bei 55°C im Wasserbad aufgetaut. Auch dieser wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Ein Mix aus 30 µl *Genisphere 2x formamide buffer*, 2.5 µl 3DNA *capture reagent* Cy3, 2.5 µl 3DNA *capture reagent* Cy5 und 25 µl H_2O wurde angesetzt und für 10 min bei 80°C und dann bei 65°C bis zur Verwendung inkubiert. Die Microarrays wurden auf 49°C vorgewärmt und dann der 3DNA-Mix auf die Arrays gegeben. Diese wurden für 2h bei 49°C inkubiert.

Post-3DNA Array 50 Capture Reagent-Hybridisierung

Das Waschen der Arrays erfolgte in 50-ml-Falkons im Hybridisierungsofen wie folgt:

• 1-mal 10 min in 2x SSC, 0.1% SDS bei 49°C (+DTT, Endkonz. 0.5-1mM)

• 2-mal für 5 min in 2 x SSC, 0.1% SDS bei RT (+DTT, Endkonz. 0.5-1 mM)
• 2-mal für 5 min in 1x SSC
• 2-mal für 5 min in 0.1 x SSC

Die Arrays wurden erneut trocken zentrifugiert und unverzüglich gescannt.

3.2.7.3 Scannen und Auswerten der Microarrays

Nach der Hybridisierung erfolgte das unmittelbare Scannen mit dem 428™ Scanner® (Affymetrix Inc., Santa Clara, USA) unter Lichtausschluss, um die höchstmögliche Fluoreszenz-Signalstärke erfassen und erhalten zu können. Mit Hilfe der *Affymetrix® Jaguar™ Software*, *version 2.0* (Affymetrix) wurden schlecht hybridisierte *Spots* ausgekreuzt, die genaue Signalstärke der *Spots* erfasst und eine Hintergrundkorrektur durchgeführt. Des Weiteren wurde der log-Ratio der Cy3-/Cy5-Signale bestimmt. Die Identifizierung different exprimierter Gene und die statistische Auswertung der Datensets erfolgte mit Hilfe des Programms *BRB-ArrayTools* (http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html, version 4.1.0-Beta_3 Release). Mit diesem Programm wurde *LOWESS* (*locally weighted scatterplot*)-*smoothing* durchgeführt. Die x-fache Expressionsänderung von Genen zwischen den beiden Forellenstämmen und/oder verschiedenen Bedingungen wird in dieser Arbeit als *Fold-Change* (FC) geführt, welcher eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen ermöglicht. Die Bezeichnungen der vorgestellten Gene und Proteine erfolgte nach Möglichkeit auf Deutsch, war dies nicht möglich, wurde der Originalname auf Englisch beibehalten. Die Beschreibung von Genprodukten erfolgte mit Hilfe von *GeneCards®* (http://www.genecards.org/).

3.2.8 Validierung differenter Expressionswerte mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) ist eine Methode zur Quantifizierung spezifischer Transkripte, um die Expressionsstärke bzw. genaue Kopienzahl eines bestimmten Gens unter verschiedenen Bedingungen bestimmen zu können. In der vorliegenden Arbeit diente diese Methode der Validierung differenter Expressionswerte ausgewählter Kandidatengene der Forellenstämme TCO und BORN in gesundem Gewebe aus dem Microarray-Experiment (siehe 3.2.7). Weiterführend wurden die Transkriptmengen der Kandidatengene in gesunden Geweben sowie nach Infektion vergleichend bestimmt. Alle Messungen mittels qRT-PCR wurden mit dem LightCycler® 480 System von Roche und dem dazugehörigen LightCycler® FastStart DNA

Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) durchgeführt. Die Berechnung der Kopienzahlen erfolgte nach dem Prinzip der relativen Quantifizierung, wofür das Gen *EEF1A1* als Referenzgen diente. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels reverser Transkription von 1.5 µg Gesamt-RNA aus dem entsprechenden Gewebe, wie unter 3.2.6 beschrieben.

3.2.8.1 Herstellung eines externen Standards

Um die genaue Kopienzahl eines Transkripts bestimmen zu können, muss ein externer Standard hergestellt werden. Dazu wurde eine Standard-PCR mit den Primern für das zu quantifizierende Transkript durchgeführt, eine Verdünnungsreihe mit dem PCR-Produkt hergestellt und aus den C_t-Werten der Verdünnungsstufen 3 bis -6 eine Eichgerade erstellt (Abbildung 5).

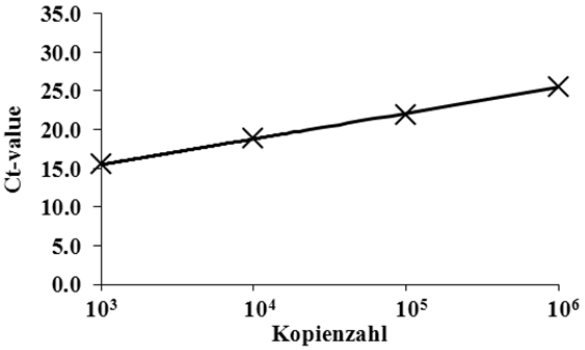

Abbildung 5 Beispiel für eine Standard-Eichgerade. Aufgetragenen wurden die Verdünnungsstufen und dazugehörige C_t-Werte. Der Regressionskoeffizient R^2 beträgt 0.999328.

Die Werte des Achsenabschnitts und der Steigung der entstandenen Geraden sind obligatorische Parameter zur Berechnung der exakten Kopienzahl:

$$\textbf{Kopienzahl}_{\textbf{Zielgen}} = 10^{\,(\text{Achsenabschnitt-}\textbf{Ct}_{\textbf{Zielgen}})/\text{Steigung})}$$

Es ist zudem möglich, eine spezifische Amplifikationseffizienz für jedes Primerpaar zu berechnen. Dieser Wert sollte ungefähr bei 2 liegen, was theoretisch einer gleichmäßigen Verdopplung der PCR-Produkt-Konzentration in jedem Amplifikationszyklus entspricht (Gibson *et al.*, 1996). Eine Abweichung von bis zu 0.5 ist jedoch unproblematisch.

$$\textbf{Amplifikationseffizienz} = 10^{\,(1/\text{Steigung})}$$

3.2.8.2 Ablauf einer qRT-PCR

Alle Komponenten für einen qRT-PCR Lauf, bestehend aus:

- 0.6 µl H_2O
- 6 µl DNA *double-strand-specific SYBR Green I dye* (Roche) inklusive *FastStart* Taq DNA Polymerase (Roche)

• je 0.2 µl *sense*-/*antisense*-Primer

• 5 µl cDNA

wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Roche) angesetzt. Das PCR-Programm enthielt folgende Schritte:

• initialer Aktivierungsschritt bei 95°C für 5 min

40 Zyklen bestehend aus:

• Denaturierung bei 95 °C für 15 s

• *Annealing* bei 60°C für 10 s

• Elongation bei 72°C für 20 s

• finale Fluoreszenz-Detektion bei 75°C für 5 s

Nach Ablauf der 40 Zyklen erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 6).

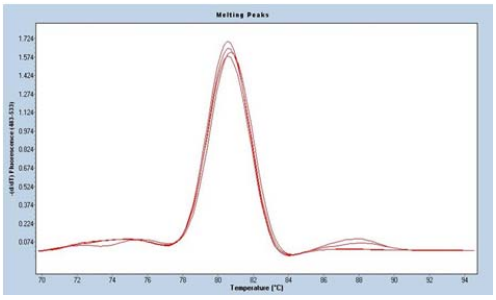

Abbildung 6 Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse.

Mit Hilfe dieser wurden die Primerspezifität und der spezifische Schmelzpunkt für jedes PCR-Produkt bestimmt. Alle entstandenen PCR-Produkte wurden dabei langsam von 70 auf 95°C erhitzt und während der Denaturierung die Abnahme der Fluoreszenz gemessen. Die resultierenden PCR-Produkte wurden auf einem 3%-igen Agarosegel aufgetrennt und auf Größe und Qualität (Doppelbanden) überprüft.

3.2.8.3 Statistische Bewertung der Berechnungen

Für die Bestimmung der Signifikanz der Ergebnisse wurde ein parametrischer T-Test oder ein nicht-parametrischer Mann-Whitney U-Test (wenn keine Normalverteilung vorlag) durchgeführt. Ein Test auf Normalverteilung der Daten erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-*Normality*-Test. Ergebnisse mit einem zweiseitigen p-Wert von ≤ 0.1 wurden als „marginal signifikant“ und p-Wert von ≤ 0.05 wurden als „signifikant“ bewertet, ein p-Wert von ≤ 0.01 bedeutete „hoch signifikant“. Für alle Expressionsdaten ist die Standardabweichung des Mittelwerts, bezeichnet als SEM (*standard error of measurement*) angegeben.

3.2.9 Identifizierung von Transkriptvarianten mittels reversem *Northern Blot*

Die Methode des reversen *Northern Blots* zur spezifischen Detektion von cDNA ist eine Variante des *Northern Blots*, welcher nach der 1975 von Edwin Mellor Southern entwickelten Methode des sogenannten *Southern Blot*s benannt wurde. Grundlegend geht es um eine sequenzspezifische Detektion von DNA/RNA mit Hilfe einer Digoxigenin-/radioaktiv markierten Sonde. Die in dieser Arbeit angewendete Methode wurde mit cDNA durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die Methode angewandt, um Transkriptvarianten der Gene *TCBP1* (*trout C-Polysaccharide binding protein* 1) und *CLEC4M* (*C-type lectin domain family 4*, *member M*) nachzuweisen.

Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin (DNA-Sonde)

Zur Durchführung eines reversen *Northern Blots* wird eine Sonde benötigt, um spezifische cDNA-Fragmente detektieren zu können. Die Sonde ist ein mit Digoxigenin-markierten dNTPs amplifiziertes DNA-Fragment. Zur Amplifizierung wurde das *DIG Nucleic Acid Detection Kit* (Roche) verwendet, welches Puffer, DIG-Mix und Enzym-Mix enthielt. Die Primer wurden jeweils so gewählt, dass ein möglichst allen Varianten gemeinsames cDNA-Fragment innerhalb der PCR entsteht. Als Negativkontrolle wurde parallel eine PCR mit unmarkierten dNTPs durchgeführt. Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte: 2 min initiale Denaturierung bei 95°C; 30 Zyklen bestehend aus 30s Denaturierung bei 95°C, 30 s Primer-*Annealing* bei 60°C, 40s Elongation bei 72°C. Final folgte ein 7-minütiger Elongationsschritt ebenfalls bei 72°C. Die Primer zur Herstellung der Sonden für die Gene *TCBP1* (amplifiziertes Produkt: 649bp) und *CLEC4M* (amplifiziertes Produkt: 434 bp) sind im Anhang A aufgeführt. Zur Berechnung der optimalen Hybridisierungstemperatur T_{opt} in *DIG Easy Hyb*-Puffer (Roche), abhängig von G/C-Gehalt und Länge der Sonde, wurden folgende Formeln verwendet (*Calculation of optimal hybridization temperature*, Roche):

$\mathbf{T_m} = 49.82 + 0.41 * (\%\ G + C) - (600/bp)$

$\mathbf{T_{opt1}} = \mathbf{T_m} - 25°C$

$\mathbf{T_{opt2}} = \mathbf{T_m} - 20°C$

$\mathbf{T_{m\ (TCBP1)}} = 49.82 + 0.41 * (51.9\%) - (600/649)$

$= 49.82 + 20.76 - 0.93$

$= \underline{\mathbf{69.65\ °C}}$

$\mathbf{T_{opt1\ (TCBP1)}} = 69.65\ °C - 25°C$

$= \underline{\mathbf{44.65°C}}$

$\mathbf{T_{m\ (CLEC4M)}} = 49.82 + 0.41 * (47.9\%) - (600/434)$

$= 49.82 + 19.64 - 1.38$

$= \underline{\mathbf{68.08°C}}$

$\mathbf{T_{opt1\ (CLEC4M)}} = 68.08\ °C - 25°C$

$= \underline{\mathbf{43.08°C}}$

$T_{opt2\ (TCBP1)}$ = 69.65 °C – 20°C = **49.65°C**

$T_{opt2\ (CLEC4M)}$ = 68.08 °C – 20°C = **48.08°C**

Die optimale Hybridisierungstemperatur für die *TCBP1*-Sonde ist 45-50°C und für die *CLEC4M*-Sonde 43-48°C.

PCR-Ansatz für die Sonde		**Negativkontrolle**	
Puffer (*vial* 3)	2.5 µl	Puffer (*vial* 3)	2.5 µl
DIG Mix (*vial* 2)	2.5 µl	dNTP-Mix	2.5 µl
Primer 5‘	2.5 µl	Primer 5‘	2.5 µl
Primer 3‘	2.5 µl	Primer 3‘	2.5 µl
Enzym-Mix (*vial* 1)	0.38 µl	Enzym-Mix (*vial* 1)	0.38 µl
cDNA (ca. 5ng)	0.25 µl	cDNA (ca. 5ng)	0.25 µl
ad H_2O	14.37 µl	ad H_2O	14.37 µl
gesamt	25 µl	gesamt	25 µl

Auftrennen der 3’RACE-PCR-Produkte

Die zuvor genspezifisch amplifizierten 3’RACE-PCR-Produkte (siehe 3.2.10) wurden zur höchstmöglichen Auftrennung in einem 3%-igen Agarosegel separiert. Die Auftrennung erfolgte für mindestens 6h bei 60V. Zur Vorbereitung der Übertragung der aufgetrennten DNA aus dem Gel auf eine Membran (*Blotten*) wurde das Gel zweimal für 15 min in Denaturierungslösung (à 150 ml), zweimal 15 min in Neutralisierungslösung (à 150 ml) und final für 20 min in 150 ml 20x SSC schüttelnd inkubiert.

2.5%-Agarosegel	
Agarose	2.25 g
0.5 x TBE	75 ml

Denaturierungslösung (300 ml)		**Neutralisierungslösung (300 ml)**	
1M NaOH	150 ml	1M Tris/HCl pH 7.5	150 ml
5M NaCl	90 ml	5M NaCl	90 ml
ddH_2O	60 ml	ddH_2O	60 ml

1M NaOH (1 L)		**5M NaCl (1 L)**	
Natriumhydroxid	40 g	Natriumchlorid	292.2 g
H_2O	1 L	H_2O	1 L

1M Tris/HCl pH 7.5 (1 L)		**1M Tris/HCl pH 9.5 (1 L)**	
Tris	121.14 g	Tris	121.14 g
H_2O	1 L	H_2O	1 L
HCl	bis pH 7.5	HCl	bis pH 9.5

20x SSC (pH 7.0)	
Natriumchlorid	175.32 g
Natriumcitrat	88.23 g
H_2O	1 L

Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran („Blotten“)

Der Blotaufbau (Abbildung 7) beinhaltete folgende Komponenten: zwei Whatman-Blotpapiere (Schleicher & Schuell BioScience, Dassel), dauerhaft in Transferpuffer (20x SSC) getaucht zur Flüssigkeitsförderung (mit Folie abgedeckt), darauf das Agarosegel, eine Nylonmembran (Amersham Biosciences, München), drei Whatman-Blotpapiere (Schleicher & Schuell BioScience) ein kleinerer Stapel fester Zellstoff (Handtuchpapier) und zuletzt ein ca. 5-6 cm hoher Stapel weicher Zellstoff um genügend Kapillarkraft zu erzeugen, durch welche die cDNA-Fragmente aus dem Gel auf die Membran befördert werden sollen. Alle Komponenten wurden genau an die Größe des Gels angepasst, bis auf die Membran, diese wurde an allen Seiten 0.5cm größer zugeschnitten. Der Transfer erfolgte üN (12-16 h) bei RT. Zur kovalenten Bindung der an die Membran geblotteten DNA-Fragmente wurde diese am nächsten Morgen 3 min mit UV-Licht bestrahlt und anschließend noch 2 h bei 80°C gebacken.

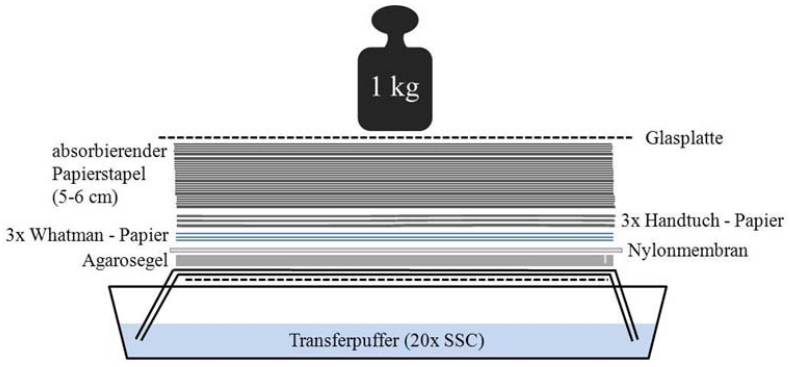

Abbildung 7 Aufbau eines Kapillarblots.

Hybridisierung der Membran mit einer sequenzspezifischen Sonde

Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung der DNA-Sonde in *DIGEasyHyb*-Puffer (Roche) wurde die Membran bei der entsprechend berechneten Hybridisierungstemperatur in einer Röhre für 2 h drehend inkubiert (Prähybridisierung). Die Sonde (5 µl PCR-Produkt in 50 µl H_2O) wurde für 5 min denaturiert und anschließend in Eiswasser abgekühlt, um eine erneute Doppelstrangbildung zu vermeiden. Der Ansatz wurde anschließend in 3 ml Hybridisierungslösung überführt und so zur Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte üN. Der Hybridisierungpuffer mit Sonde wurde für weitere Verwendungen aufgefangen und bei -20 °C gelagert.

Detektion der Signale

Die Membran wurde zunächst zweimal für 5 min bei RT in Waschlösung I gespült. Darauf folgten zwei 15-minütige Waschschritte bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur in Waschlösung II schüttelnd im Wasserbad. Es folgte eine 5-minütige Inkubation in DETEKI, als Vorbereitung auf das 30-minütige Blockieren unspezifischer Epitope auf der Membran mit DETEKII. Die Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper anti-Digoxigenin-AP, hergestellt aus Schaf (Roche), erfolgte mind. 30 min (bis mehrere Stunden) in DETEKI (1:5000. 3 µl AK in 15 ml DETEKI). Anschließend wurde die Membran zweimal für 15 min mit DETEKI gespült. Zur Vorbereitung auf die Entwicklung der Signale des Antikörpers wurde die Membran kurz in DETEKIII geschwenkt und anschließend unter Lichtausschluss mit Entwicklungslösung (1:100, 6 ml DETEKIII + 60 µl NBT/BCIP) beträufelt. Die an den anti-DIG gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) katalysiert die enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe von BCIP in das entsprechende Indoxyl, das zu einem Keton tautomerisiert. Dieses dimerisiert das Keton zu blauem Indigo, wobei H^+ freigesetzt werden, welche schließlich das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zu purpurnen Diformazan reduziert (Stuyver *et al.*, 2003). Beide Farbstoffe fallen dabei in unmittelbarer Nähe der AP aus und färben die Umgebung der markierten DNA-Sonde dunkelviolett. Starke Signale wurden bereits nach wenigen Minuten sichtbar.

Waschlösung I (2xSSC/0.1%SDS)		**Waschlösung II (0.1xSSC/0.1%SDS)**	
20 x SSC	100 ml	20 x SSC	5 ml
20% SDS	5 ml	20% SDS	5 ml
ddH_2O	895 ml	ddH_2O	990 ml

DetecI (0.1 M Tris/HCl pH 7.5. 0.15 M NaCl)		**DetecII**	
1M Tris/HCl. pH 7.5	100 ml	DETECI	50 ml
5M NaCl	30 ml	10 x Roti-Block	5 ml
ddH_2O	870 ml		

DetecIII	
1M Tris/HCl. pH 9.5	100 ml
1M $MgCl_2$	50 ml
5M NaCl	20 ml
ddH_2O	830 ml

3.2.10 Versionen der Polymerasekettenreaktion

Zur gezielten Amplifizierung spezifischer DNA/cDNA Fragmente mit Hilfe von genspezifischen Oligonukleotiden wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) entsprechend dem Prinzip von Saiki *et al.* (1988) angewendet. Zum Einsatz kam diese bei der Aufklärung von *UTR*-Regionen von cDNAs (RACE-PCR), Klonierungsexperimenten und der Quantifizierung von cDNA-Kopien (qRT-PCR). Zur vereinfachten Handhabung wurden die PCR-Komponenten stets im Mastermix angesetzt.

Standard-PCR

Zur Amplifizierung spezifischer DNA/cDNA-Fragmente wurde folgender Mastermix angesetzt:

Mastermix (1-fach für 25 µl)

2.5 µl 10 x Reaktionspuffer
1.0 µl 10 mM dNTP-Mix
1 µl *Sense*-Primer (50 pmol/µl)
1 µl *Antisense*-Primer (50 pmol/µl)
0.1 µl *FastStart Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
DNA/cDNA
ad H_2O

Die Reaktionen erfolgten in 0.5-ml-Reaktionsgefäßen im Thermocycler T1 von Biometra. Der Mastermix wurde stets für einen zusätzlichen Ansatz berechnet.

Die Amplifikationsreaktion verlief entsprechend des folgenden Standardprogramms:
Initiale Denaturierung: 95°C, 5 min
30 Zyklen à
• Denaturierung: 95°C. 30 s
• Primer-*Annealing*: 60°C, 30 s
• Elongation: 72°C, angepasst, je nach Fragmentlänge 1 min/kb DNA
• Terminale Elongation: 72°C, 4 min

Wegen der Syntheserate der Polymerase von ~2 Kbp pro Minute wurde die Elongationszeit bei längeren Fragmenten ggf. angepasst. Bei geringer Ausbeute wurden die PCR Zyklen ggf. auf bis zu 35 erhöht.

Touch down-PCR

Zur Erhöhung der Amplifikationsspezifität der gewünschten Sequenzen wurde die Methode der *Touch down*-PCR gewählt, wobei eine Präamplifikation beginnend bei 68°C für 10 Zyklen mit pro Zyklus um 1°C sinkender Temperatur erfolgte:

Initiale Denaturierung: 95°C, 5 min
10 Zyklen à
• Denaturierung: 96°C, 30 s
• Primer-*Annealing*: 68°C **(-1°C/Zyklus)**. 30 s
• Elongation: 72°C, angepasst, je nach Fragmentlänge 1 min/kb DNA
30 Zyklen à
• Denaturierung: 96°C, 30 s
• Primer-*Annealing*: 60°C, 30 s
• Elongation: 72°C, angepasst. je nach Fragmentlänge 1 min/kb DNA
Terminale Elongation: 72°C, 4 min

3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3´-RACE)

Die Amplifikation des 3'-Bereichs einer cDNA erfolgte mit Hilfe der *Touch down*-PCR. Dabei wurde ein genspezifischer *Sense*-Primer und ein am PolyA-Schwanz bindender *Gene Racer*™-3'-Primer (*Antisense*) gewählt. Im Anschluss erfolgte mit dem aufgereinigten PCR-Amplifikat eine

nested PCR, wobei ein amplifikatspezifischer *Sense*-Primer und ein *Racer*^{TM} 3´*Nested* Primer, ebenfalls am PolyA-Schwanz bindend, zum Einsatz kamen.

5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3´-RACE)

Zur Aufklärung des 5'-Bereichs einer cDNA wurde das *Gene-Racer™ Kit* von Invitrogen entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

3.2.11 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

Um nach Beendigung der Amplifikation Größe und Quantität der PCR-Produkte visuell überprüfen zu können, wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook *et al.* (1989) aufgetrennt. Dafür wurde zu jedem Ansatz ca. 3 µl DNA Ladepuffer gegeben. Dieser Ansatz wurde, je nach erwarteter Größe der Produkte, auf ein entsprechend prozentiges Agarosegel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 100 V in 0.5 x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die anschließende Visualisierung der DNA erfolgte durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (2.5% (v/v) in TBE-Agarosegel) mittels UV-Licht. Die Herstellung des Agarosegels, des TBE-Puffers und des Ladepuffers erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben.

3.2.12 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung erfolgte mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Zum PCR-Ansatz (25 µl) wurden 100 µl Bindepuffer gegeben, gut gemischt und auf den Filter eines *High Pure Spin Filter Tubes* pipettiert. Der Filter wurde durch Zentrifugation bei RT für 20 s bei 11000 rpm (12851rcf) getrocknet. Die Nukleinsäuren im Filter wurden zunächst mit 500 µl und anschließend mit 250 µl Waschpuffer gereinigt, dazwischen wurde je für 20s bei 11000 rpm und RT zentrifugiert. Um jegliche Pufferrückstände aus dem Filter zu entfernen wurde 2 min bei 11000 rpm trocken zentrifugiert. Danach wurde die Säule zur Eluierung der DNA in ein 1.5-ml-Reaktionsgefäß überführt und je nach Verwendungsvorhaben der DNA 10-50 µl ddH_2O auf den Filter gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 10-30 min wurde für 1 min bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen. Das Eluat wurde zur vollständigen Reinigung von restlichen PCR-Komponenten final für 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

3.2.13 Elution von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Die gewünschten Banden wurden so genau wie möglich aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1.5-ml-Reaktionsgefäß mit 500 µl Bindepuffer (Roche) überführt. Das Gelstück wurde bis zum vollständigen Auflösen bei 55°C inkubiert. Durch zwischenzeitliches Anschnipsen der Reaktionsgefäße wurde der Prozess unterstützt. Anschließend wurden 250 µl Isopropanol hinzugegeben und durch Vortexen gut gemischt. Dieser Ansatz wurde anschließend auf den Filter einer Säule gegeben und es wurde weiter verfahren wie unter 3.2.12 beschrieben.

3.2.14 Klonierung von PCR-Produkten

Um die Sequenzierung eines gesamten PCR-Produktes und das Erfassen mehrerer Transkript- oder Genvarianten zu gewährleisten, bietet es sich an, Fragmente in einen Vektor einzuklonieren und ausgehend von diesem die Sequenzierreaktion durchzuführen. In dieser Arbeit wurde das *pGEM®-T*-Vektor-System (Promega, Mannheim) verwendet. Das Plasmid hat einen T-Überhang an den Insertionsstellen, was zum einen eine Rezirkulation des Vektors verhindert und so eine hohe Ligationseffizienz ermöglicht. Zum anderen generieren die meisten Polymerasen einen A-Überhang an die PCR-Produkte was diese kompatibel für den Vektor macht.

Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurden 8.2 µl der aufgereinigten DNA-Fragmente (siehe 3.2.12) mit 1 µl 10 x T4 Ligationspuffer, 0.5 µl *pGEM®-T*-Vektor und 0.5 T4-Ligase (Promega) gemischt. Dieser Ansatz wurde kurz gevortext, zentrifugiert und für mind. 30 min bei RT oder alternativ bei 4°C üN inkubiert. Eine Lagerung bei -20°C erfolgte bis zur Transformation.

Herstellung kompetenter E. coli XL1-Blue MRF´-Zellen nach HANAHAN

Die *E. coli*-Derivate XL1-*Blue* MRF´ (Stratagene, La Jolla, USA) wurden auf eine Tetracyclin-haltige Nähragarplatte ausgebracht und üN bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und in 5 ml SOB-Medium erneut üN bei 37°C geschwenkt. Am nächsten Morgen wurden 5 ml dieser Kultur in 50 ml PSI-Medium überführt. In einem 1L-Erlenmeyerkolben wuchsen die Bakterienzellen bis zu einer Dichte von OD_{600}= 0.45-0.55. Nach dem Pelletieren bei 3000 x g, für 15 min wurden sie in 16 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis und ein zweiter Zentrifugationsschritt mit darauffolgender Resuspension in 4 ml eiskalter RF2-Lösung schloss sich an. Die Lösung

wurde erneut auf Eis inkubiert und dann unter sofortigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff aliquotiert. Die kompetenten Bakterienzellen wurden bei -80°C gelagert.

TY-Kulturagar mit Tetracyclin

Baktotrypton	1.6%
Hefeextrakt	1.0%
NaCl	85.6 mM
Agar	2.0%

nach dem Autoklavieren

Tetracyclin	0.1%

PSI-Flüssigmedium

Baktotrypton	2.0%
Hefeextrakt	0.5%
NaCl	10.0 mM
KCl	5.0 mM

nach dem Autoklavieren

$MgSO_4$	20.0 mM

steril filtrieren

RF2

Glycerol	15%
$CaCl_2$	75 mM
RbCl	10 mM
MOPS (pH 6.8)	10 mM

pH 6.8 mit NaOH einstellen und steril filtrieren. bei -20°C lagern

SOB-Flüssigmedium

Baktotrypton	2.0%
Hefeextrakt	0.5%
NaCl	10.0 mM
KCl	2.5 mM

nach dem Autoklavieren

$MgCl_2$	10.0 mM
$MgSO_4$	10.0 mM

RF1

Glycerol	15%
RbCl	100 mM
MnCl	50 mM
KCl	30 mM
$CaCl_2$	10 mM

pH 5.8 mit Essigsäure einstellen und steril filtrieren. bei -20°C lagern

Transformation von E. coli XL1-blue MRF

In Vorbereitung auf die Transformation wurde der Ligationsansatz für 5 min bei 60°C inkubiert und kurz auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wurde auf 35-40 µl kompetente Zellen gegeben und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte ein 1.5-minütiger Hitzeschock bei 42°C im Thermoblock mit direkt anschließender Abkühlung auf Eis. Um ein besseres Koloniewachstum der *E.coli*-Zellen zu ermöglichen, wurden diese mit 160 µl SOB-Flüssigmedium versetzt und für

1 h bei 37°C vorgeschüttelt. Dieser Ansatz wurde auf einer Agarplatte mit Galaktose, IPTG und Ampicillin ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

SOB-Flüssigmedium		**Ty-Medium**	
Baktotrypton	20 g	Trypton	16 g
Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	10 g
nach dem Autoklavieren:		NaCl	5 g
Glucose	3.6 g	Agar	20 g
NaCl	0.58 g	H_2O	1 L
$MgCl_2$	0.95 g		
$MgSO_4$	1.2 g		
KCl	0.19 g		
H_2O	1 L		

Insertkontrolle

Um das gewollte Plasmid zur Sequenzierung zu erhalten, wurden je Agarplatte fünf Klone gepickt, mit denen dann eine Kolonie-PCR durchgeführt wurde. Die Kolonie wurde dazu kurz in einen Standard-PCR-Mix (siehe 3.2.10) getaucht und dann in einem 1.5-ml-Reaktionsgefäß aufbewahrt. Konnte das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert werden, wurde die entsprechende Kolonie üN bei 37°C in 1.5 ml TY-Medium aufgeschüttelt.

Plasmidisolierung mittels Alkalischer Lyse

Durch das Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) kann Plasmid-DNA aus kleinen Volumina von Bakterien-Kulturen isoliert werden. Nach diesem Prinzip arbeitet auch das *ZR Plasmid Miniprep™-Classic* (Zymo Research, Freiburg im Breisgau), mit welchem entsprechend dem empfohlenen Herstellerprotokoll die Isolierung und Aufreinigung der Plasmide zur anschließenden Sequenzierung gewonnen wurden.

3.2.15 DNA-Sequenzierung

Die für die vorliegende Arbeit benötigten DNA-Sequenzierungen wurden im Servicelabor für DNA-Sequenzierung des Leibniz Instituts für Nutztierbiologie durchgeführt, in der Regel mit dem Sequenzierautomaten ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Bis zu 600 bp lange Sequenzen wurden mit dem *MegaBACE™DNA Analysis System* (Amersham

Biosciences) und dem *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* verwendet, für längere bis zu 1.2 kb lange DNA-Abschnitte das *Long Read DNA Sequencing System* (LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe) verwendet. Jede Sequenzposition wurde mindestens doppelt bestimmt.

3.2.16 *In silico*-Strukturanalyse von Kandidatengenen

Alle hierfür verwendeten Programme, mit Ausnahme von MEGA v4.0, sind frei verfügbare Online-*Tools*. Physikalische und chemische Parameter wie Molekulargewicht und theoretischer isoelektrischer Punkt (pI) der hypothetischen Proteine wurde mit dem *ProtParam Tool* (http://web.expasy.org/protparam/) berechnet. Die schematische Darstellung charakteristischer und konservierter Proteindomänen erfolgte jeweils mit dem *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART, http://smart.embl-heidelberg.de/). Für die Prüfung auf Signalpeptid und/oder Transmembrandomänenlokalisationen wurde das Vorhersageprogramm *Philius Transmembrane Prediction Server* (http://www.yeastrc.org/philius/pages/philius/runPhilius.jsp) verwendet. Die Protein-Alignments wurden mit dem Programm *ClustalW2* (Multiple Sequence Alignment, http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) erstellt. Zur Berechnung der phylogenetischen Stammbäume kam das Programm *Molecular Evolutionary Genetics Analysis (*MEGA*) Software Version 4.0* (Tamura *et al.*, 2007) zum Einsatz.

3.2.17 Phylogenetische Stammbaumanalyse von Proteinsequenzen

Die entsprechenden Analysen wurden mit dem Programm MEGA v4.0 durchgeführt. Mit Hilfe des *Bootstrap*-Tests mit 10000 Replikaten Saitou und Nei (1987) wurde berechnet, mit welcher Häufigkeit verschiedene Taxa zusammen geordnet wurden.

3.2.18 Zellkulturtechniken

Alle Versuche im Zellmodell erfolgten mit der Zellline RTgill-W1 (American Type Culture Collection, Manassas, USA). Entwickelt wurde die Linie von Bols (1994). Diese entstammt Fibroblastenzellen einer 15 Monate alten Primärkultur, die aus Kiemenfragmenten der Regenbogenforelle gewonnen wurden. Die Kultivierung erfolgte in angereichertem Kulturmedium in *CELLSTAR® Cell Culture*-Flasks (75 cm^2, Greiner Bio-One, Frickenhausen) im CO_2-Brutschrank (Memmert, Schwabach) bei 19.5°C. Alle Arbeiten mit der Zelllinie erfolgten an der *HERAsafe* HS Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher Scientific).

Kulturmedium

L-15 Leibovitz Medium	500 ml
nicht hitzeinaktiviertes Fötales Bovines Serum (FBS)	55 ml
L-Glutamin	5.5 ml

Auftauen von Kiemen-Fibroblastenzellen

Zum Animpfen von Kiemen-Fibroblastenzellen wurde eine in Flüssigstickstoff eingefrorene Kultur im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die aufgetaute Suspension wurde in 10 ml L-15 Leibovitz Medium (Biochrom AG, Berlin) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 800 rpm pelletiert, in 20 ml Medium resuspendiert und dann in das finale Kulturgefäß (Flask, Biochrom AG) überführt. Bakterielles Wachstum in der Kultur wurde durch die Zugabe von 200 µl Penicillin/Streptomycin (P/S) verhindert. Ein erster Mediumwechsel erfolgte nach ca. 24 h.

Pflege der Zellen

Mindestens alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel der Zellen vorgenommen. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS, Biochrom AG) gewaschen und anschließend 20 ml Medium und 200 µl P/S hinzugegeben. Zur Aufteilung dicht gewachsener Zellen wurden die an den Flasks haftenden Zellen mit 0.9 ml Trypsin (Biochrom AG) beträufelt und kurz inkubiert. Das komplette Lösen der Zellen vom Boden wurde mikroskopisch überprüft und anschließend in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und auf zwei neue Flasks mit bereits vorgelegtem Medium (je 15 ml + 200 µl P/S) aufgeteilt.

Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden gewaschen und enzymatisch vom Gefäßboden gelöst. Die Suspension wurde in 8 ml Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml Falkon überführt. Die Zellen werden für 3 min bei 800 rpm pelletiert und anschließend in 10 ml Einfriermedium (Kulturmedium + 0.5 ml DMSO) resuspendiert. Das Aliquotieren erfolgte in 2 ml TPP-Kryoröhrchen (Biochrom AG), welche mit 1.5 ml Zellsuspension befüllt wurden. Die Kryoröhrchen wurden in eine Kryobox gefüllt mit Isopropanol zunächst bei -20°C eingefroren und nach ca. einer Woche in Flüssigstickstoff-Tanks zur Langzeitlagerung überführt.

Stimulation von Kiemen-Fibroblastenzellen mit A. salmonicida

Zur Untersuchung der Genexpression von Komplementgenen nach einer Infektion wurde die Zelllinie RTgill-W1 herangezogen. Dazu erfolgte eine 24-stündige Stimulation der Zellen mit einer attenuierten *A. salmonicida*-Kultur ($1x10^4$). Zunächst wurden die Zellen auf CELLSTAR® 6 Well Zellkultur Multiwell Platten (16 ml pro Well, Greiner Bio-One) aufgeteilt. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde die entsprechende Konzentration Stimulanz in 2.5 ml L-15 Leibovitz Medium (Biochrom AG) in jedes Well gegeben. Nach der gewünschten Einwirkzeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS (Biochrom AG) gewaschen und zur direkten Lyse der Zellen 350 µl RLT-Lysis-Puffer (Qiagen) dazugegeben. Die lysierte Zellsuspension wurde anschließend in 1.5-ml-Reaktionsgefäße überführt und 3.5 µl ß-Mercaptoethanol hinzugefügt. Bis zur RNA-Isolation wurden die Ansätze bei -20°C eingefroren.

Herstellung einer attenuierten A. salmonicida-Kultur

Für die Stimulation der Zelllinie RTgill-W1 wurde eine abgeschwächte *A. salmonicida*-Kultur hergestellt. Zunächst wurde eine Vorkultur in 100ml Trypton Soya Broth angesetzt und bei RT bis zu einer OD_{600} von 0.5 wachsen gelassen. Um die koloniebildenden Einheiten (KBE) zu bestimmen, wurden 5 und 50 µl der Kultur auf TSB (*Tryptone Soya Broth*)-Agar ausplattiert und nach zwei bis drei Tagen Wachstum ein Viertel der Platte ausgezählt. Anschließend wurde die gesamte Kultur für 60 min bei 80°C im Wasserbad hitzeinaktiviert und 50 µl der inaktivierten Kultur wurden nochmals ausplattiert um das komplette Absterben der Bakterien zu überprüfen. Die Kultur wurde für 15 min bei 3000 rpm in 50-ml-Falkons pelletiert. Die Pellets wurden zweimal mit jeweils 10 ml L-15 Leibovitz Medium (ohne FBS) gewaschen und für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden vereinigt und in 1/10 ml Kulturmedium der Vorkultur aufgenommen (100 ml abzüglich der Menge für das Überprüfen der optischen Dichte).

3.2.19 Infektion von Regenbogenforellen mit *A. salmonicida*

Zur Infektion von Regenbogenforellen der Stämme TCO und BORN wurde der *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*-Wildtyp-Stamm JF 2267 verwendet. Die Bakterien wurden aus kryokonservierten Ansätzen (Microbank™, PRO-LAB Diagnostics, Cheshire, UK) für 98 h bei 15°C auf Kasein-Pepton Sojamehl-Pepton Agar (LB Broth; SIFIN, Berlin) kultiviert und anschließend in LB-Medium (SIFIN, Berlin, Germany) für weitere 48 h inkubiert. Die initialen Kulturen wurden mittels Gram-Färbung auf Reinheit überprüft. Die Bakteriensuspension wurde

für 10 min bei 4300 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in steriler 0.9%-iger NaCl-Lösung gewaschen und auf 10^4 Bakterien/ml verdünnt. Die Konzentration der Verdünnungsstufen wurde durch Auszählen von koloniebildenden Einheiten auf CASO-Agarplatten (Roth, Karlsruhe) überprüft. 72 Forellen je Stamm (siehe 3.1.3) wurden mit einer Benzocainlösung (50 ng/ml) narkotisiert und mit einer infektiösen Dosis *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* von 10^4 KBE intraperitoneal infiziert. Die übrigen Forellen dienten als Kontaktfische zur Kontrolle des Übertragungspotenzials der Erreger. Die Fische wurden vermessen, gewogen und für gewebespezifische Expressionsanalysen von Kandidatengenen wurde die Milz, Kiemen und Leber von je vier Fischen zu acht Zeitpunkten (6 und 12 Stunden, 1, 2, 3, 7 und 14 Tage) entnommen (siehe 3.2.1).

4. ERGEBNISSE

4.1 Transkriptomstudien in der Milz

Dem Hauptziel dieser Arbeit folgend, immunrelevante Kandidatengene zu identifizieren, die den Gesundheitsstatus im Forellenstamm BORN aufrechterhalten und an frühen, angeborenen Abwehrmechanismen beteiligt sind, wurde die Milz, als wichtigstes Organ der Abwehr, für holistische Transkriptomanalysen mit dem salmonidenspezifischen 16K-cDNA-GRASP-Microarray ausgewählt. Die Analysen wurden vergleichend zwischen gesunden Forellen der Stämme TCO und BORN durchgeführt. Milzgewebe wurde aus jeweils 15 Fischen pro Forellenstamm präpariert, die darin enthaltene Gesamt-RNA isoliert und auf Microarrays hybridisiert. Im Ergebnis ermöglichte dieser Versuchsansatz die Identifizierung von Genen der Immunabwehr und ließ gleichzeitig Aussagen zur unterschiedlichen Expression dieser Gene im gesunden und ungestressten Grundzustand in den differenten Selektionslinien zu. Die identifizierten Kandidatengene wurden danach in verschiedenen Transkriptionsstudien hinsichtlich ihrer stressspezifischen Expression näher charakterisiert und Gene mit noch unvollständiger oder fehlender mRNA-Sequenz wurden strukturell aufgeklärt. Die Ergebnisse der Microarray-Analyse wurden bereits in Köbis *et al.* (2013) publiziert. Dieser Artikel sowie eine Liste über alle different exprimierten Gene (FC ≥ 1.5) sind dem Anhang beigefügt.

4.1.1 Geringeres Expressionsniveau der meisten Gene im Stamm BORN

Die Microarray-Analyse ergab 807 different exprimierte Gene beider Forellenlinien mit einem FC von ≥ 1.5 und einem p-Wert von ≤ 0.001. Von diesen waren 802 Gene geringerer exprimiert im Stamm BORN im Vergleich zum Stamm TCO. Für fünf Gene wurde ein höheres Expressionsniveau im Stamm BORN ermittelt. Ungefähr ein Drittel der als different exprimiert identifizierten Gene (n=236) ist bisher noch nicht annotiert bzw. zeigten keine Sequenzhomologie zu bereits bekannten Genen.

Für eine Funktionsübersicht wurden 200 Gene des Gensets mit einem FC bis ≥ 3 und darüber hinaus alle immunrelevanten Gene mit einem FC bis ≥ 1.5 für weitere Analysen ausgewählt (n=227). Mit Hilfe des Programms *GO Term Mapper* wurden den Genen sogenannte *GO Slim terms* zugeordnet, was eine Sortierung dieser gemeinsamen Funktionswege ermöglichte (Abbildung 8).

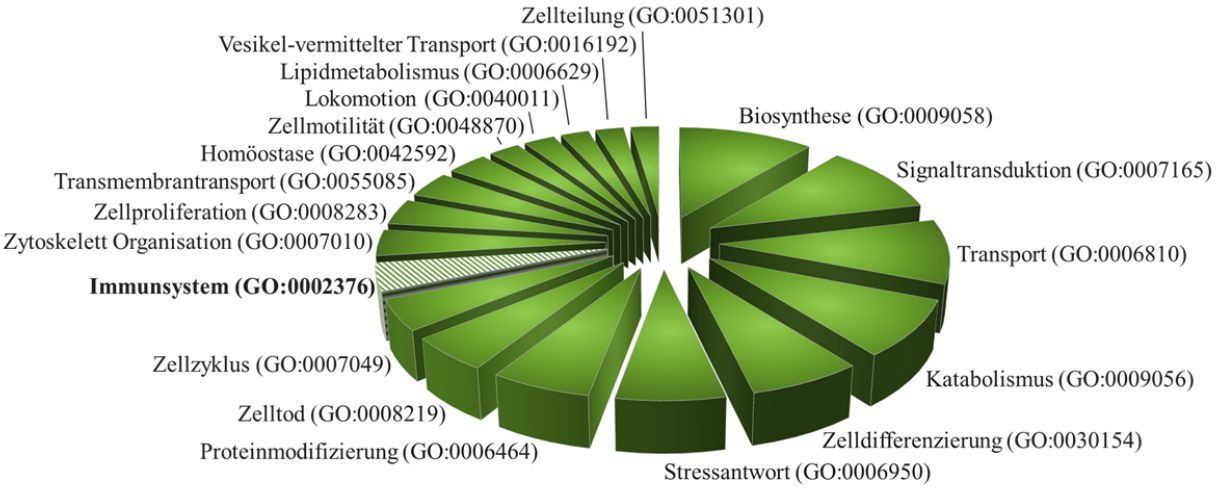

Abbildung 8 Funktionelle Klassifizierung different exprimierter Gene im Milzgewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN.
Es wurden 227 Gene in die Analyse einbezogen (FC ≥ 3, immunrelevante Gene FC ≥ 1.5).

Die Genprodukte der fünf Gene mit vergleichsweise geringstem Transkriptionsniveau im Stamm BORN sind: (I) *nuclear distribution protein C* (*NUDC*, -10.9-fach), involviert in die Regulation der mitotischen Spindelausbildung und Chromosomensegregation während der Mitose; (II) Ribonuklease T2 (*RNASET2*, -8.1-fach), welche an Abwehrmechanismen gegen Pathogene beteiligt ist; (III) Zytochrom-c-Oxidase UE 1 (*COX1*, -8.1-fach), welche als Komponente der Atmungskette die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysiert; (IV) Wachstumshormon 2 (*GH2*, -7.6-fach), ein Protein, welches Gewebe zur Ausschüttung von wachstumsförderndem Insulin-*Like* Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) stimuliert und (V) Peroxiredoxin 1 (*PRDX1*, -7.2-fach), welches in die Regulation von Redoxreaktionen involviert und an TNF-Signalwegen beteiligt ist.

4.1.2 Klassifizierung der im Stamm BORN geringer exprimierten Gene

In den folgenden Kapiteln erfolgt die Einteilung der Top 200 der different exprimierten Gene und zusätzlich alle immunrelevanten Gene mit einem Minimum-FC von 1.5 in biologische Prozesse. Die funktionelle Betrachtung der Gene soll einen allgemeinen Überblick über die verschiedenen Transkriptomaktivitäten der Milz beider Forellenstämme verschaffen. Die angegebenen Expressionsunterschiede sind auf den Stamm BORN bezogen.

Zelluläres Wachstum und Proliferation (GO: 0008283)

Die biologischen Funktionen ‚Zelluläres Wachstum und Proliferation' gehören zu fundamentalen und komplexen Prozessen eines Organismus. Es wurden mehrere, im Forellenstamm BORN

geringer exprimierte Gene identifiziert, deren Genprodukte an beiden Prozessen beteiligt sind: (I) CDC28 Proteinkinase, regulatorische UE (*CKS1B*, -2.8-fach), welche den Zellzyklus kontrolliert, indem sie an die katalytische Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinase bindet; (II) Cyclin B1 (*CCNB1*, -2.4-fach), essenziell für die Kontrolle des Zellzyklus‘ während der G2/M-Transition; des Weiteren zwei Rezeptoren (III) Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor-*Like* 1 (*FGFRL1*, -5.4-fach), welcher als *multi copy*-Gen in Knochenfischen vorliegt (Trueb *et al.*, 2005) und Mitogenese sowie Differenzierung beeinflusst und (IV) Wachstumsfaktor Rezeptor-gebundenes Protein 2 (*GRB2*, -2.5-fach), welcher einen Komplex zwischen Proteinen bildet, die in Wachstumssignalwege involviert sind und so das Wachstum von Zellen beeinflusst.

Zellbewegung (GO:0048870, *GO:0040011)*

Die Bewegung von Zellen ist ein hochdynamischer Prozess, der hauptsächlich durch das Aktinnetzwerk innerhalb der Zellen ermöglicht wird. Vor allem intrazellulärer Transport, Morphogenese und das Immunsystem sind von der Fortbewegung von Zellen abhängig (Ananthakrishnan, 2007). Es wurden verschiedene Gene mit vergleichsweise verminderter Transkriptmenge in der BORN-Forelle identifiziert, die direkt an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind. Diese kodieren für: (I) Calpain 2 (*CAPN*, - 3.8-fach), welches an der Neubildung von Zytoskelettverbindungen an die Plasmamembran während Zellfusion und Zellmotilität beteiligt ist; (II) *actin related protein 2/3 complex*, *subunit 5* (*ARPC5*, -3.4-fach), das die Aktinpolymerisation reguliert und (III) Stathmin-*Like* 1 und 3 (*STMN1/3*, -2.7/-2.5-fach), die in die Regulation von Mikrotubulibewegungen innerhalb der Zelle involviert sind. Myosin, *heavy chain* 9 (*MYH9*, -1.9-fach) ist am ordnungsgemäßen Ablauf des intrazellulären Transports beteiligt.

Vesikeltransport (GO: 0016192)

Am Vesikeltransport sind Moleküle beteiligt, die für die akkurate Verteilung der Proteine zwischen den Kompartimenten des sekretorischen Wegs sorgen. Das Syntaxin 12-kodierende Gen (*STX12*) ist 5.4-fach geringer exprimiert im Stamm BORN und ist im recycelnden Kompartiment des Endosoms lokalisiert sowie an der Fusion von Endosomen und Lysosomen mit dem Phagosom beteiligt. Weitere im Stamm Born geringer exprimierte Gene und deren Genprodukte sind: (I) *biogenesis of lysosomal organelles complex-1*, *subunit 2* (*BLOC1S2*, -2.5-fach), das an der Bildung lysosomaler Organellen und intrazellulärem Vesikeltransport beteiligt

ist; (II) *trafficking protein particle complex 3* (*TRAPPC3*, -1.9-fach), welcher Transportvesikel vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zur *cis*-Golgimembran verbringt; (III) *golgi vesicular membrane-trafficking protein* (*BET1*, -1.4-fach), das als SNARE-Protein am Andocken von ER-abgeleiteten Vesikeln an der *cis*-Golgimembran beteiligt ist und (IV) *charged multivesicular body protein* 3 (*VPS24*, -0.7-fach), welches Transmembranproteine in Lysosomen und Vakuolen mittels dem Multivesikelkörperchen (MVB)-Weg sortiert. Das Membran-assoziierte (C3HC4) Ring-Finger-3-Protein (*MARCH3*, -1.2-fach) reguliert möglicherweise den Vesikeltransport entlang des endosomalen *Recycling*-Pathways. Erste Untersuchungen zu MARCH3 ergaben eine Kolokalisierung mit MARCH2 und STX 6 in peripheren Vesikeln. Nach einer Überexpression von MARCH3 wurde die Transferrin Aufnahme gehemmt wodurch sich eine veränderte Rückverteilung des Trans-Golgi Netzwerk Proteins TGN46 ergab (Fukuda *et al.*, 2006).

Proteinubiquitinierung

Die Ubiquitinierung von Proteinen ist eine Form der Proteinmodifizierung (GO: 0006464) und trägt zur Aktivität, Stabilität und Lokalisierung von Proteinen bei und somit zur Regulation wichtiger Prozesse wie Mitose/Meiose und der Homöostase von Proteinen im Allgemeinen (Kerscher *et al.*, 2006). Ubiquitinierung ist ein unverzichtbarer Prozess beim Abbau veralteter und fehlgefalteter Proteine und somit essenziell für das Wachstum und die Gesundheit eines Organismus, indem ein ausgeglichenes Proteinlevel aufrechterhalten wird (Lipkowitz und Weissman, 2011). Ein geringeres Expressionsniveau im Stamm Born wurde für das Proteasome-26S-UE-kodierende Gen (*PSMD2*, -2.1-fach) ermittelt, eine regulatorische Untereinheit der Proteinabbau-Maschinerie. Es wurden vier weitere Gene mit erniedrigtem Transkriptlevel identifiziert, deren Genprodukte an der Ubiquitinierung beteiligt sind: (I) Ubiquitin-spezifische Peptidase 48 (*USP48*, -5.1-fach); (II) Ubiquitin Carboxyl-terminal Esterase L3 (*UCHL3*, -2.7-fach); (III) Ubiquitin-spezifische Peptidase 4 (*USP4*, -2.3-fach) und (IV) Ubiquitin-konjugierndes Enzym E2G 1 (*UBE2G1*, -1.7-fach). MARCH3 (-1.2-fach) spielt als E3-Ligase eine entscheidende Rolle bei der Übertragung von Ubiquitin auf Zielproteine. Das Gen kodierend für *ubiquitin-like modifier activating enzyme 2* (*UBA2*, -5-fach) ist an einem alternativen Proteinmarkierungssystem beteiligt.

Energiemetabolismus (GO: 0006629)

Einige im Stamm BORN geringer exprimierte Gene sind am Energiemetabolismus beteiligt: (I) *COX1*, welches für eine Komponente der Atmungskette kodiert und dort die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysiert. Lipide spielen eine wichtige Rolle als Signalmoleküle, Membrankomponenten und natürlich als Energiequelle. Wichtig für die Mobilisierung von Energie und Oxidierung von Fetten ist das Fettsäuren-bindende Protein 7 (*FABP7*, -5.4-fach), welches für Aufnahme und Transport von Fetten eine Rolle spielt, ebenso wie das *sterol-regulatory element binding transcription factor 1* (*SREBP1*, -2.0-fach).

4.1.3 Darstellung der immunrelevanten different exprimierten Immungene

Die Milz als wichtigstes sekundäres Immunorgan im Fisch beinhaltet alle Zelltypen, die nötig sind, um angemessen auf das Eindringen von Pathogenen in den Wirt zu reagieren und eine entsprechende Immunantwort auszulösen (Fänge und Nilsson, 1985). Entgegen unserer Erwartungen sind lediglich 7% der 807 different exprimierten Gene Funktionen des Immunsystems zuzuordnen. Insgesamt sind 57 Gene mit Bedeutung in immunrelevanten Prozessen (FC $\geq$ 1.5) im Stamm BORN geringer exprimiert im Vergleich zum Stamm TCO (GO: 0002376). Einen Überblick über das gesamte Set immunrelevanter Gene bietet Tabelle 26 im Anhang B. Diese Gene sind u.a. an folgenden Wegen der angeborenen und erworbenen Immunantwort involviert: Toll-*Like* Rezeptoren (TLR) der TLR-Kaskade erkennen Pathogen-assoziierte-molekulare Muster (PAMPs). Sie repräsentieren die erste Linie der Verteidigung im Fisch (Rebl *et al.*, 2010). Zwei Gene kodierend für negative Regulatoren der TLR-Kaskade (Liew *et al.*, 2005) sind geringer exprimiert im Stamm BORN: IL-1 Rezeptor-*Like* 1 (*IL1RL1/ST2L*, -1.2-fach) und IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 3 (*IRAK3*, -0.6-fach). Es wird hypothetisiert, dass Mitglieder der MARCH-Proteinfamilie an der Ubiquitinierung von TLRs beteiligt sein könnten (Shi *et al.*, 2011). Ein weiterer Pathogenerkennungs-Rezeptor ist CLEC4M (in Säugern), welcher von dem im Stamm BORN ebenfalls geringer exprimierten Gen *C-type lectin domain family 4, member M* (*CLEC4M*, -2.2-fach) kodiert wird. Das funktionale Homolog der Maus (SIGNR3) ermöglicht eine frühe Resistenz gegen Erreger (Tanne *et al.*, 2009).

Das Gen *HMGB1* (-1.6-fach) kodiert für ein nicht-klassisches proinflammatorisches Protein, welches chemotaktische Zellbewegung und die Ausschüttung von Zytokinen anregt, indem es an Zelloberflächen-Rezeptoren wie TLR2 und TLR4 bindet (Yang *et al.*, 2005).

Ein sich mit der TLR-Signalkaskade ergänzender Mechanismus ist die Akute-Phase-Antwort, welche von zwei Genen repräsentiert wird kodierend für: *Trout c-polysaccharide binding protein 1* (*C1QTNF3/TCBP1*, -3.1-fach), welches bereits von Bayne *et al.* (2001) und Teles *et al.* (2011) als positives APP beschrieben wurde und Albumin (*ALB*, -2.3-fach), welches als negatives APP agiert (Castell *et al.*, 1989). Ein weiterer Vertreter der APPs ist Ferritin (mittlere UE) (*FTL*, -2.1-fach), welches bakterielles Wachstum durch seine eisenbindende Aktivität hemmt.

Die Akute-Phase-Reaktion wird oft von der Aktivierung des Komplementsystems begleitet (Nakao *et al.*, 2011), welches als eine der wichtigsten Kaskaden des angeborenen Immunsystems in der Lage ist, Pathogene früh zu erkennen und auszuschalten bzw. weitere proinflammatorische Prozesse in Gang zu setzen. Es wurden fünf different exprimierte Gene identifiziert, die für Proteine dieses Systems kodieren: (I) Komplement Komponente C1q Rezeptor CD93 (*CD93*, -7.2-fach), ein potenzieller Rezeptor für C1q und MBL2, durch deren Bindung die phagozytotische Aktivität von Monozyten und Makrophagen erhöht wird; (II) Komplement Komponenten 5a Rezeptor (*C5aR*, -2.6-fach), ein Rezeptor für das Anaphylatoxin C5a, welches die Chemotaxis von Immunzellen erhöht; (III) Komplement Faktor D (*CFD*, -2.5-fach), eine Schlüsselpeptidase, die den alternativen Weg des Komplementsystems auslöst; (IV) Komplement Komponente 4 (*C4*, -1.5-fach), Bestandteil der C3-Konvertase des klassischen Weges und (V) Komplement C1q-*Like* Protein 4 (*C1QL4*, -1.1-fach), dessen Funktion bisher unbekannt ist.

Im Stamm BORN sind ebenso Gene geringer exprimiert, die am adaptiven Immunsystem beteiligt sind. Diese sind u.a. dem Interleukin-2 und -6 (IL-2/-6) Signalweg zuzuordnen (*RAF1*, *CSNK2A1*, *JUN*, *GRB2*), welche die Proliferation und Reifung von T- und B-Lymphozyten (in Säugern) fördern. Sowohl IL-2 als auch IL-6 wurden bereits in der Regenbogenforelle strukturell und funktional untersucht (Costa *et al.*, 2011; Diaz-Rosales *et al.*, 2009).

Des Weiteren sind different exprimierte Gene in die Antigenpräsentation involviert, kodierend für (I) CD4 Molekül (*CD4*, -2.0), welches mit MHC-Klasse-II-Proteinkomplexen interagiert und somit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aktivierung von T-Helferzellen spielt (Stet *et al.*, 2003); (II) MHC Klasse I b Region (*MHCIb*, -2.2-fach); (III) MHC Klasse I A (*MHCI*, -1.4-fach) und (IV) MHC Klasse I (*MHCIuba*, -0.8-fach).

Höher exprimierte Gene im Stamm BORN gegenüber dem Stamm TCO

Von den fünf im Stamm BORN höher exprimierten Genen sind zwei annotiert. Das Gen *ASAH1* kodiert für die saure Ceramidase 1 (0.8-fach), eine Lipid-Hydrolase, die in den Lysosomen für die Degradierung von Ceramiden in Sphingosine und freie Fettsäuren verantwortlich ist und zum anderen das Gen *CCDC101* kodierend für das *coiled-coil*-Domänen enthaltende Protein 101 (0.6-fach), eine Untereinheit von Histonacetyltransferase-Komplexen, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind.

4.1.4 Validierung differenter Expression ausgewählter immunrelevanter Kandidatengene im Milzgewebe gesunder Regenbogenforellen

Für weitere Analysen wurden 13 in der Microarray-Analyse als different exprimiert identifizierte immunrelevante Kandidatengene ausgewählt: *HMGT1*, *HMGB1*, *ST2L*, *IRAK3*, *MARCH3*, *C1QL4*, *TCBP1*, *CLEC14A*, *CD93*, *CLEC4M*, *C4*, *CFD* und *C5aR*. Deren Expression wurde zunächst vergleichend für die Stämme TCO und BORN in einer quantitativen *Real-Time* PCR (qRT-PCR) im Milzgewebe gesunder Forellen überprüft (Abbildung 9).

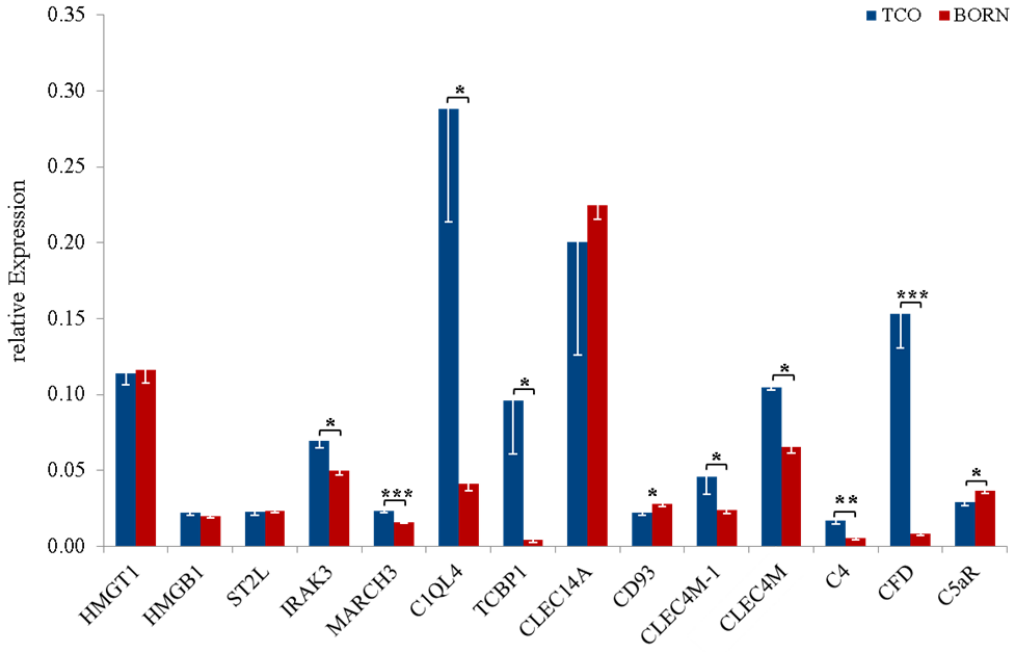

Abbildung 9 Expressionsvalidierung der immunrelevanten Kandidatengene im Milzgewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN.
Vergleichend dargestellt sind die Mittelwerte der *EFF1A1*-normalisierten Kopienzahlen (-SEM) von jeweils acht Forellen beider Stämme. Signifikante Transkriptionsunterschiede sind folgendermaßen gekennzeichnet: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$. Die differente Expression ermittelt durch die Microarray-Analyse konnte für sieben Gene bestätigt werden. Für das Gen *CLEC4M* wurden zwei Transkriptvarianten identifiziert, welche als CLEC4M-1/-2 designiert sind.

Mit Hilfe der relativen Quantifizierung wurden die exakten Kopienzahlen für jedes Gen berechnet, zu den Kopien des Haushaltsgens *EEF1A1* ins Verhältnis gesetzt und vergleichend für beide Forellenstämme aufgetragen. In Tabelle 1 ist für jedes Kandidatengen der FC zwischen den Stämmen, bezogen auf den Stamm BORN, mit entsprechendem SEM aufgeführt, wobei die bestätigten Werte dick gedruckt sind. Dabei zeigte sich für die Gene *IRAK3*, *MARCH3*, *C1QL4*, *TCBP1*, *CLEC4M* (*-1*), *C4* und *CFD* ein signifikant geringeres Expressionsniveau im Stamm BORN wie durch das Microarray-Experiment ermittelt. *CD93* und *C5aR* hingegen sind im Stamm BORN signifikant höher exprimiert, wenn auch nur moderat (0.26- bzw. 0.27-fach). Für die Gene *HMGT1*, *HMGB1*, *ST2L* und *CLEC14A* wurde kein signifikanter Transkriptionsunterschied festgestellt.

Tabelle 1 Übersicht über validierte Expressionsunterschiede der Kandidatengene im Milzgewebe beider Stämme mittels qRT-PCR.

Chemokine	HMGT1	HMGB1							
FC	1.02	-1.12							
SEM	0.10	-0.12							
TLR-Kaskade	ST2L	IRAK3	MARCH3						
FC	1.02	**-1.39***	**-1.44*****						
SEM	0.13	-0.11	-0.09						
Komplementsystem	C1QL4	TCBP1	CLEC14A	CD93	CLEC4M	CLEC4M-1	C4	CFD	C5aR
FC	**-6.97***	**-22.60***	1.12	1.26*	**-1.60***	**-1.95***	**-3.31****	**-18.88*****	1.27*
SEM	-1.99	-13.44	0.08	0.13	-0.19	-0.30	-0.75	-3.22	0.11

Der mit Abstand größte Transkriptionsunterschied wurde für die Gene *CFD* (-18.9-fach, $p=10^{-6}$) und *TCBP1* (-22.6-fach, p=0.02) ermittelt, welche direkt bzw. indirekt am Komplementsystem beteiligt sind (siehe 4.2.2 und 4.2.3).

4.2 Strukturanalyse und Phylogenie unbekannter immunrelevanter Kandidatengene

Von den different exprimierten, immunrelevanten Genen ermittelt durch die Microarray-Analyse wurden acht noch nicht annotierte Kandidatengene hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt, da diese zu früh aktivierten Faktoren der Immunantwort zählen. Als Beitrag zur Ergänzung verfügbarer Immungen-Sequenzen der Regenbogenforelle erfolgte eine Sequenzaufklärung der mRNA für diese Gene, welche bereits annotiert wurden (Tabelle 2). Die vollständigen cDNA-Sequenzen sind im Anhang C zu finden. Die Gene werden in den folgenden Kapiteln entsprechend der Reihenfolge in der Tabelle besprochen.

Für jedes Gen werden die mittels qRT-PCR validierten Expressionsdaten, die aufgeklärte cDNA-Sequenz und die Analyse der putativen Proteinstruktur dargestellt. Zur Klärung evolutionärer

Verwandtschaftsverhältnisse werden ebenso Sequenzvergleiche mit Proteinen verschiedener Organismen und phylogenetische Analysen gezeigt.

Tabelle 2 Überblick über die innerhalb dieser Arbeit sequenzierten mRNA-Sequenzen.

Genname	Funktion	*Accession*-Nummer	
		mRNA	Protein
ST2L	negativer Regulator der TLR-Kaskade	HF678447	CCT61382
IRAK3	negativer Regulator der TLR-Kaskade	HF678448	CCT61383
MARCH3	Ubiquitinierung	NM_001246354	NP_001233283
TCBP1	Pathogenerkennung, Akute Phase	HE974763	CCK33845
TCBP2	Pathogenerkennung, Akute Phase	HF546064	CCO02601
CLEC4M	Pathogenerkennung	HF559225	noch nicht zugeteilt
CLEC4M-1	Pathogenerkennung	HF559226	noch nicht zugeteilt
CD93	Pathogenerkennung	HE963050	CCJ27811
CFD	Serinprotease des Komplementsystems	NM_001246346	NP_001233275

4.2.1 Strukturanalyse von Genen der TLR-Kaskade

Interleukin 1 Receptor-Like 1 (ST2L)

Das *ST2L*-Gen wurde mit einem FC von -2.22 ($p=1.18x10^{-15}$) im Stamm BORN als geringer exprimiert identifiziert. Dieser Wert konnte nicht validiert werden mittels qRT-PCR (FC 1.02, p= 0.87). ST2L ist ein negativer Regulator und Mitglied der TLR/IL-1-Rezeptor Superfamilie (Brint *et al.*, 2004). Die mRNA umfasst 2391 Basenpaare (bp) (HF678447), der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) 1740 bp. Somit ergibt sich ein Protein mit 580 Aminosäuren (aa) (CCT61382). Das molekulare Gewicht des Proteins beträgt 65.7 kilo Dalton (kDa) und hat einen isolektrischen Punkt (pI) bei 5.5. Mit dem Online-Programm *Philius* für Signalpeptid-und Transmembrandomänen-Lokalisationen konnte ein 25aa langes Signalpeptid vorhergesagt werden sowie ein extrazellulärer N-Terminus und ein zytoplasmatischer C-Terminus. Eine *in silico*-Analyse der putativen Proteinsequenz ergab die in Abbildung 10 schematisch dargestellten Proteindomänen.

Abbildung 10 Schematische Darstellung der hypothetischen Proteinstruktur von ST2L.
Abgebildet sind die funktionsbestimmenden Domänen Immunoglobulin (IG)-, Immunglobulin-*Like* (*IG-Like*), Toll-Interleukin 1-Resistenz (TIR). Das N-terminale Signalpeptid ist rot markiert. Der blaue Balken stellt eine TMD dar.

Das Protein enthält eine N-terminal gelegene Immunoglobulin (IG)-Domäne an Aminosäure-Position 49 bis 232, gefolgt von einer *IG-Like*-Domäne an Position 248 bis 346. Daran schließt sich eine Transmembrandomäne an, die sich von Position 349 bis 371 erstreckt. Die C-terminale Toll-Interleukin 1-Resistenz (TIR)-Domäne reicht von aa-Position 394 bis 570 (Abbildung 11a).

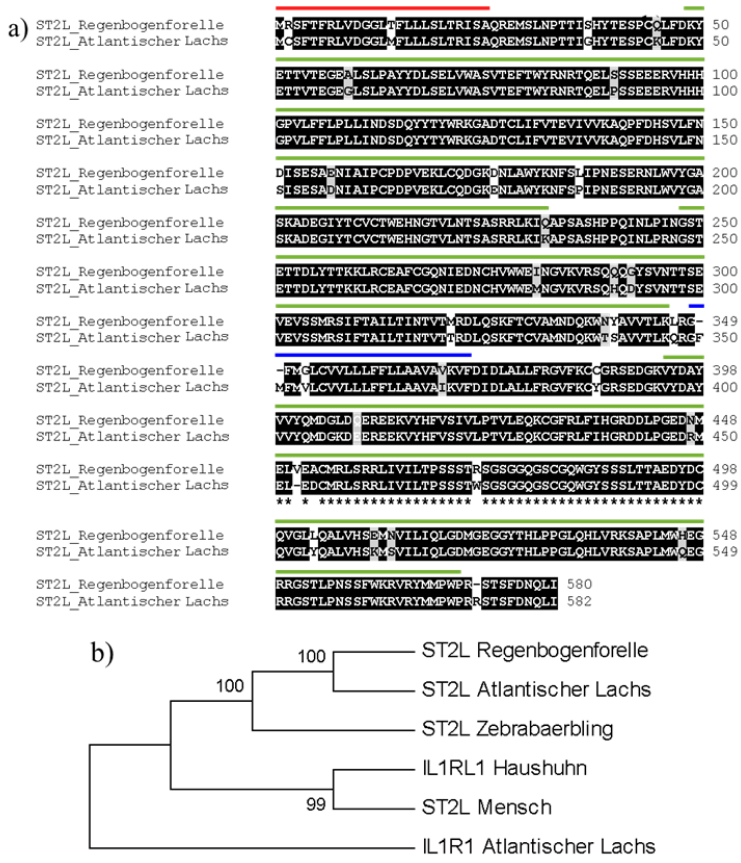

Abbildung 11 Alignment und Stammbaum von ST2L.
a) Alignment der putativen ST2L-Proteinsequenz von Regenbogenforelle (CCT61382) und Atlantischem Lachs (NP_001117022). Identische Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche sind grau unterlegt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 10 entsprechend dargestellt. **b)** Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit folgenden Protein-Sequenzen: Regenbogenforelle (CCT61382), Atlantischer Lachs: NP_001117022, Zebrabärbling: XP_002663470, Haushuhn: ENSGALT00000027102, Mensch: BAA82405, Außengruppe: IL1R1 Atlantischer Lachs, NP_001117105.

Die ST2L-Proteinsequenz der Regenbogenforelle zeigte mit 94% eine sehr hohe Übereinstimmung zu der des Atlantischen Lachses. Auch die Proteindomänen waren in beiden Arten gleichermaßen vorhanden. Die ST2L-Sequenz des Zebrabärblings zeigte hingegen nur 42% Ähnlichkeit. Die Sequenzen von Haushuhn und Mensch sind klar von denen der Fische getrennt (Abbildung 11b). Als Außengruppe wurde die IL1R1-Proteinsequenz des Atlantischen Lachses verwendet.

Interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3)

Die Microarray-Analyse ergab eine geringere Expression für *IRAK3* im Stamm BORN mit einem FC von -1.59 ($p=1.21x10^{-14}$), die verminderte Expression konnte *via* qRT-PCR bestätigt werden (-1.39-fach, p=0.001). IRAK3 ist ein negativer Regulator der TLR-Signalkaskade und wird vornehmlich in Monozyten oder Makrophagen exprimiert (Wesche *et al.*, 1999). Die Sequenzlänge der innerhalb dieser Arbeit bisher sequenzierten mRNA beträgt 1388 bp (HF678448) mit einem ORF von 1041 bp. Das putative Protein besteht aus 347 aa (CCT61383) mit einem molekularen Gewicht von 39.7 kDa und einem pI von 7.7. Weder ein Signalpeptid noch Transmembrandomänen konnten ermittelt werden (Abbildung 12). Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich die *DEATH*-Domäne von aa-Position 4 bis 96, die charakteristisch für Proteine ist, die am Zelltod beteiligt sind. C-terminal befindet sich eine STYKc (**S**er/**T**hr/T**y**r **K**inase)-Domäne.

Abbildung 12 Schematische Darstellung der charakteristischen Proteindomänen von IRAK3.
Das Protein enthält eine DEATH- und eine Ser/Thr/Tyr Kinase (STYKc) –Domäne.

Abbildung 13a zeigt den Vergleich der IRAK3-Proteinsequenz der Regenbogenforelle mit der des Dreistachligen Stichlings. Der Dreistachlige Stichling ist der am nächsten verwandte Teleosteer der Regenbogenforelle, für den eine Sequenz von IRAK3 bereits bekannt ist. Die IRAK3-Sequenzen zeigen eine 56%-ige Übereinstimmung. IRAK3 der Regenbogenforelle ist deutlich kürzer, die DEATH- und Ser/Thr/Tyr Kinase (STYKc) -Domäne ist in beiden Sequenzen vorhanden. Die Sequenz vom Zebrabärbling zeigt eine entferntere Verwandtschaft (Abbildung 13b). Die IRAK3-Sequenzen des Wildkaninchens und des Menschen bilden ein Cluster und zeigen hohe Übereinstimmung. Als Außengruppe diente die Proteinsequenz von IRAK4 des Atlantischen Lachses.

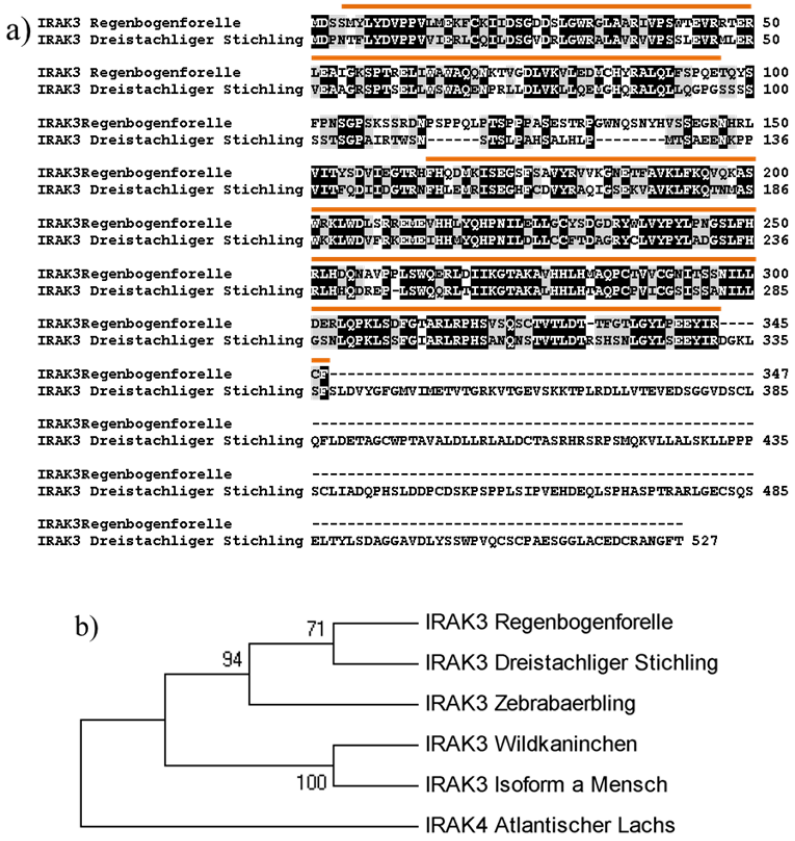

Abbildung 13 Alignment und Stammbaum von IRAK3.
a) Alignment der putativen Irak3-Proteinsequenzen der Regenbogenforelle (CCT61383) und Dreistachligen Stichlings (ENSGACT00000025550). Identische Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche sind grau unterlegt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 12 entsprechend dargestellt. **b)** Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit folgenden Protein-Sequenzen: Regenbogenforelle (CCT61383), Dreistachliger Stichling: ENSGACT00000025550, Zebrabärbling: AAH98615, Wildkaninchen: XP_002711289, Mensch: NP_009130, Außengruppe: IRAK 4 Atlantischer Lachs, NP_001135238.

E3 Ubiquitin-Protein Ligase (MARCH3)

Das MARCH3-kodierende Gen wurde mit einem FC von -2.24 ($p=1.7x10^{-19}$) im Milzgewebe von BORN-Forellen als geringer exprimiert identifiziert. Die Messung der Transkripte mittels qRT-PCR bestätigte das Ergebnis der Microarray-Analyse mit einem Wert von -1.44 ($p=5x10^{-6}$). MARCH3 ist ein Mitglied der MARCH-Proteinfamilie, deren Mitglieder u.a. die Ubiquitinierung von Immunrezeptoren auf Zelloberflächen regulieren (Nathan und Lehner, 2009). Die sequenzierte mRNA von *MARCH3* besteht aus 1757 bp (NM_001246354). Der ORF umfasst 828 bp und ergibt ein putatives Protein, das aus 276 aa besteht (NP_001233283) und ein molekulares Gewicht von 30.9 kDa und einen pI von 6.5 aufweist. Das Protein besitzt kein Signalpeptid. Mit

Hilfe des Online Programms SMART erfolgte eine *in silico*-Analyse der putativen Proteinstruktur und eine schematische Darstellung typischer Proteindomänen (Abbildung 14).

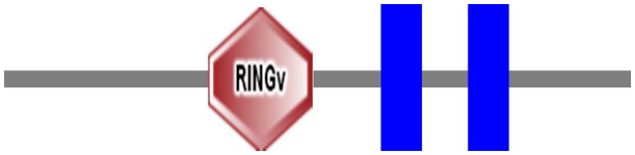

Abbildung 14 Schematische Darstellung der hypothetischen Proteinstruktur von MARCH3.
Das Sechseck stellt die Ring Finger Domäne dar. Die blauen Balken stehen für die TMDs.

Das hypothetische MARCH3 Protein besitzt eine typische RING (*Really Interesting New Gene*)-Finger-Domäne, die die Aminosäuren 86 bis 146 umfasst (Abbildung 15a).

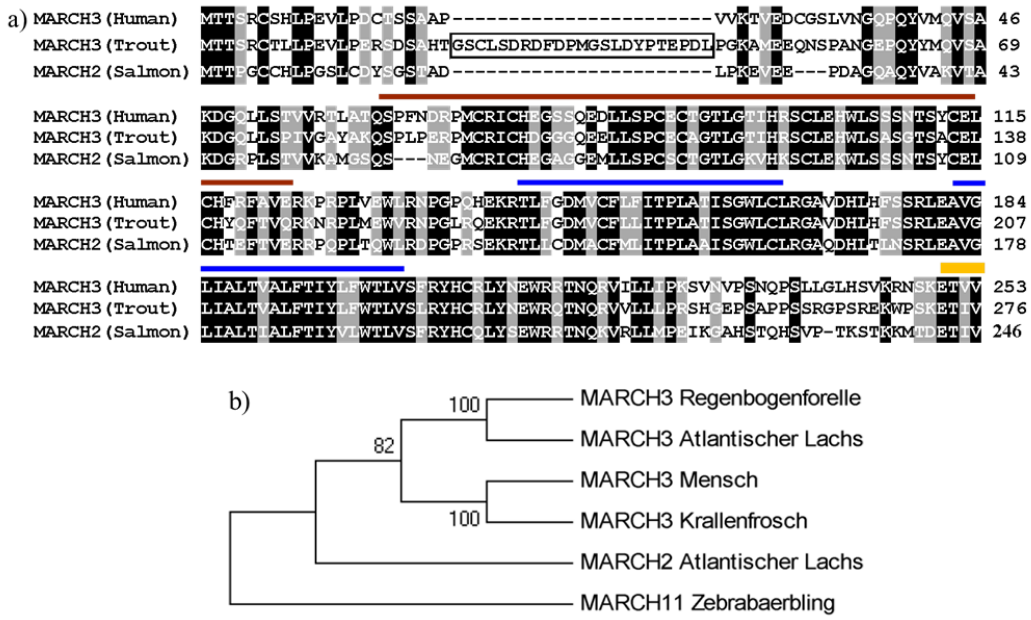

Abbildung 15 Alignment und Stammbaum von MARCH3.
a) Alignment der MARCH3 Aminosäuresequenz der Regenbogenforelle (NP_001233283) und dem Ortholog im Menschen (NP_848545) verglichen zur MARCH2 Aminosäuresequenz des Lachses (NP_001135370). Übereinstimmende Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche grau dargestellt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 14 entsprechend dargestellt. Das PDZ-bindende Motif wurde gelb markiert. Das umrahmte 23-aa Sequenzfragment existiert nur in MARCH3 der Regenbogenforelle. **b)** Phylogenetische Stammbaumanalyse von MARCH3 und MARCH2 Proteinsequenzen: MARCH3 Regenbogenforelle: NP_001233283, MARCH3 Atlantischer Lachs: NP_001135117, MARCH3 Mensch: NP_848545, MARCH3 Krallenfrosch: ENSXETG00000005160, MARCH2 Atlantischer Lachs: NP_001135370, Außengruppe: MARCH11 Zebrabärbling, XP_001338632.

Im C-terminalen Bereich des Proteins befinden sich zwei Transmembrandomänen, die sich über die Aminosäurereste 167 bis 187 sowie 205 bis 225 erstrecken. Am C-Terminus befinden sich vier hochkonservierte Aminosäuren, die ein PDZ-bindendes Motif bilden. MARCH3 der

Regenbogenforelle beinhaltet im N-terminalen Bereich ein 23 aa langes Fragment, welches in keiner bisher bekannten MARCH3-Sequenz anderer Fische oder Säuger zu finden ist. Die MARCH3-Sequenz der Regenbogenforelle zeigt eine starke Homologie zu der des Menschen und zu MARCH2 vom Atlantischen Lachs (Abbildung 15a). Im phylogenetischen Stammbaum wird die hohe Verwandtschaft der MARCH3-Sequenzen der Regenbogenforelle und des Atlantischen Lachses deutlich (Abbildung 15b). Überraschend ist die Clusterbildung der Sequenzen zwischen Mensch und Krallenfrosch. MARCH2 vom Lachs ist trotz hoher Homologie phylogenetisch am weitesten entfernt. MARCH11 vom Zebrabärbling diente als Außengruppe.

4.2.2 Strukturanalyse von Genen der Akuten Phase Reaktion

Trout C-Polysaccharide Binding Protein 1 (TCBP1)

Der Expressionsunterschied des Gens *TCBP1* ermittelt durch die Microarray-Analyse betrug -4.08 ($p=3.02x10^{-10}$) in der Milz von BORN-Forellen. Diese Differenz konnte *via* qRT-PCR mit einem Wert von -22.56 bestätigt werden (p=0.02). TCBP1 ist bisher kaum untersucht, Kodama *et al.* (1999) beschrieben TCBP1 als Opsonin, welches eine Erhöhung der Phagozytose von Pathogenen bewirkt. Innerhalb unserer bisherigen Sequenzanalysen konnten fünf Transkriptvarianten nachgewiesen werden. Die bisher längste sequenzierte mRNA, designiert als Transkriptvariante 1 (HE974763), ist 1059 bp lang, der ORF umfasst 735 bp. Das resultierende Protein besteht aus 245 aa (CCK33845) mit einem molekularen Gewicht von 27.1 kDa und einem pI von 6.2. Es wird ein Signalpeptid, bestehend aus den ersten 52 Aminosäuren des Proteins, vorhergesagt, eine TMD ist nicht enthalten. In Abbildung 16 ist die Isoform 1 von TCBP1 schematisch dargestellt mit einer C-terminalen *Complement component C1q*-Domäne, die sich von aa-Position 92 bis 240 erstreckt.

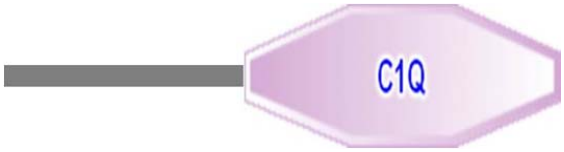

Abbildung 16 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur der Isoform 1 von TCBP1.
Das Protein enthält eine typische *Complement component C1q*-Domäne.

Bisher gibt es keine Sequenz im Fisch oder Säuger, die eine höhere Sequenzhomologie mit der Isoform 1 von TCBP1 zeigt als die des *Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3-*

Like (CTRP3-Like, XP_003458735) im Buntbarsch (Tilapia) mit lediglich 33% Übereinstimmung (Abbildung 17a).

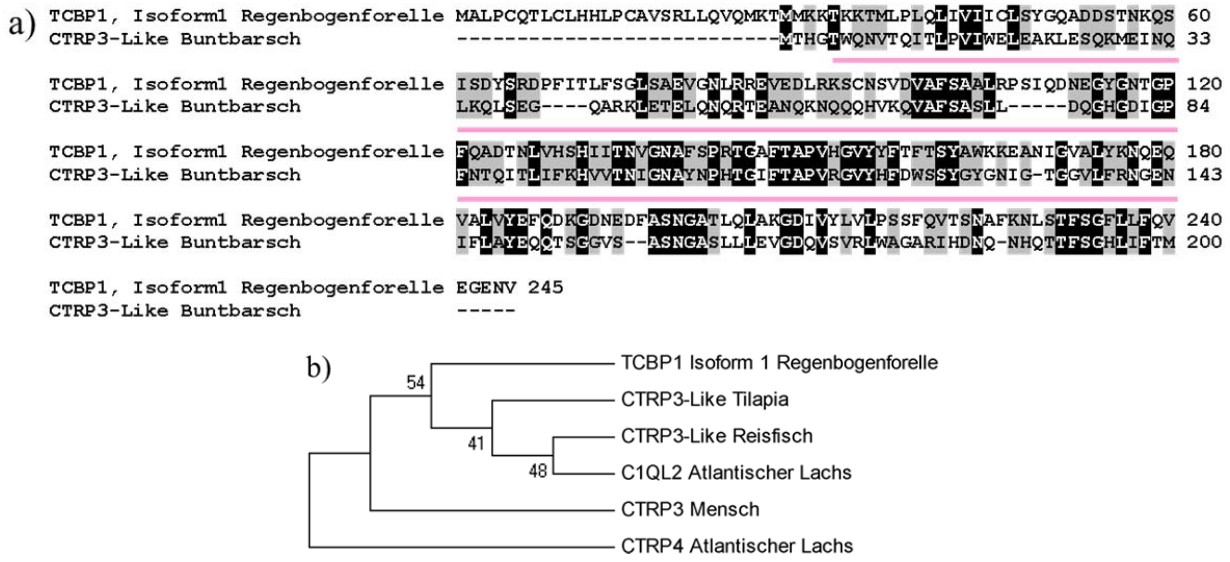

Abbildung 17 Alignment und Stammbaum von TCBP1.
a) Alignment der Proteinsequenzen von TCBP1, Isoform 1 der Regenbogenforelle (CCK33845) und dem CTRP3-*Like*-Protein der Tilapie (XP_003458735). Identische Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche sind grau unterlegt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 16 entsprechend dargestellt. **b)** Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit folgenden Protein-Sequenzen: TCBP1 Regenbogenforelle: CCK33845, CTRP3-*Like* Tilapie: XP_003458735, CTRP3-*Like* Reisfisch: ENSORLT00000005232, C1QL2 Atlantischer Lachs: NP_001134256, CTRP3 Mensch: CAE45998, Außengruppe: CTRP4 Atlantischer Lachs: NP_001135203.

Der phylogenetische Stammbaum zeigt die geringe Verwandtschaft von TCBP1 zu den homologen Sequenzen anderer Fische (Abbildung 17b). CTRP3 des Menschen zeigt das geringste Verwandtschaftsverhältnis zu TCBP1. Als Außengruppe wurde CTRP4 vom Atlantischen Lachs verwendet.

Trout C-Polysaccharide Binding Protein 2 (TCBP2)

Das *TCBP2*-Gen wurde nicht über die Microarray-Analyse als Kandidatengen identifiziert sondern zur Komplementierung möglicher Initiatoren des Komplementsystems ausgewählt. Dennoch wurde auch für dieses Gen eine geringere Expression im Milzgewebe der BORN-Forellen gefunden (-2-fach, p=0.0125). TCBP2 wurde von Murata *et al.* (1995) als CRP-Homolog beschrieben, welche im Säuger Kalzium-abhängig an pathogene Oberflächen binden und so inflammatorische Kaskaden auslösen, womit sie zu den Akute-Phase-Proteinen gehören (Bayne und Gerwick, 2001). Die *TCBP2*-mRNA ist 791 bp lang (HF546064) und der ORF umfasst 672 bp. Das hypothetische Protein besteht aus 224 aa (CCO02601) mit einem

molekularen Gewicht von 25.5 kDa und einem pI von 5.3. Eine Vorhersage mit *Philius* ergab ein 19 aa langes N-terminales Signalpeptid, eine extrazelluläre Lokalisation des Proteins und keine Transmembrandomänen. Abbildung 18 zeigt die Pentraxin-Domäne des Proteins, über die das Protein an Phosphocholin, Bestandteil pathogener Oberflächen, bindet und das Komplementsystem auslösen kann (Thompson *et al.*, 1999). Sie bildet eine diskoidal pentamerische Form und macht mit 206 der insgesamt 224 aa 92% des Proteins aus.

Abbildung 18 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur von TCBP2.
N-terminal befindet sich ein Signalpeptid (rot), der restliche Teil des Proteins enthält eine Pentraxin-Domäne.

TCBP2 zeigt eine 59%-ige Übereinstimmung mit der CRP-Sequenz vom Barramundi, Signalpeptid und Pentraxindomäne sind auch in dieser enthalten (Abbildung 19a).

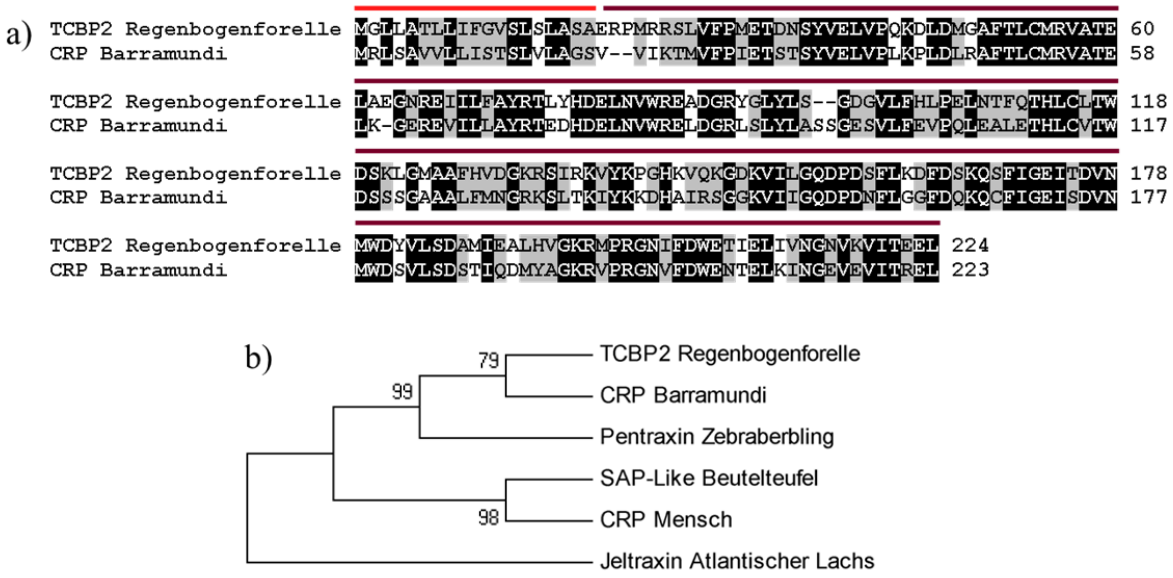

Abbildung 19 Alignment und Stammbaum von TCBP2.
a) Alignment der TCBP2-Proteinsequenzen der Regenbogenforelle (CCO02601) und Barramundi (ADX06859). Identische Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche sind grau unterlegt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 18 entsprechend dargestellt. **b)** Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit folgenden Protein-Sequenzen: TCBP2 Regenbogenforelle: CCO02601, CRP Barramundi: ADX06859, Pentraxin Zebrabärbling: CAM46930, SAP-*Like* Beutelteufel: XP_003767917, CRP Mensch: NP_000558, Außengruppe, Jeltraxin Atlantischer Lachs: ACI33251.

Der phylogenetische Stammbaum zeigt eine Clusterbildung dieser Sequenzen und eine Verwandtschaft zum Pentraxin des Zebrabärblings (Abbildung 19b). Die Sequenzen des Beutelteufels und des Menschen zeigen eine entferntere Verwandtschaft. Jeltraxin vom Atlantischen Lachs wurde als Außengruppe verwendet.

4.2.3 Strukturanalyse von Genen des Komplementsystems

C-type lectin domain family 4, member M (CLEC4M, CD209 antigen-like protein D)

Für die Transkripte des Gens *CLEC4M* wurde ein unterschiedliches Niveau im Milzgewebe beider Forellenstämme von -3.19 ($p=6.70x10^{-8}$) ermittelt. Zusätzlich zur vollständigen Sequenz haben wir eine Transkriptvariante (Transkriptvariante 1, *CLEC4M-1*) des Gens gefunden, welcher das zweite Exon fehlt. Deshalb wurde mittels qRT-PCR der Transkriptionsunterschied beider Varianten gemessen. Dieser betrug für *CLEC4M* -1.6 (p=0.0013) und *CLEC4M-1* -1.95 (p=0.002). CLEC4M gehört zur C-Typ Lektin-Familie und ist als Pathogenerkennungs-Rezeptor (PRR) in der Lage, Kohlenhydrate, z.B. als Bestandteil bakterieller Zellwände, direkt zu erkennen und zu binden, wodurch weitere Immunreaktionen in Gang gesetzt werden (Arason, 1996). Die bisher sequenzierte *CLEC4M*-mRNA ist 1350 bp lang (HF559225) mit einem ORF von 684 bp und entsprechender Proteinsequenz von 228 aa (*Accession*-nr. noch nicht zugeteilt). Das hypothetische Protein besitzt eine molekulare Masse von 26.2 kDa und einen pI von 6.2. Die mRNA der Transkriptvariante 1 ist 96 bp kürzer (HF559226). Der ORF besteht aus 588 bp, das entsprechende Protein ist 196 aa lang (*Accession*-nr. noch nicht zugeteilt). Die molekulare Masse ist mit 22.5 kDa entsprechend geringer, der pI mit 5.38 ebenfalls kleiner als die Werte von CLEC4M. Keine der beiden Proteinvarianten ist mit einem Signalpeptid ausgestattet. CLEC4M besitzt, im Gegensatz zur Transkriptvariante 1, eine Transmembrandomäne, wobei der N-Terminus zytoplasmatisch und der C-Terminus extrazellulär orientiert ist. In Abbildung 20 sind die Proteinstrukturen beider Isoformen schematisch gezeigt (SMART).

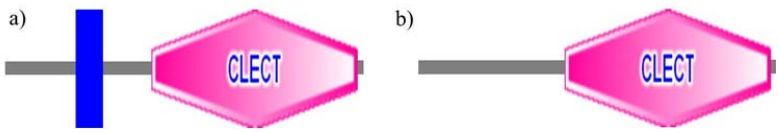

Abbildung 20 Schematische Darstellung der Proteindomänen der CLEC4M-Isoformen.
a) CLEC4M enthält eine TMD b) Isoform 1 (ΔExon2) enthält keine TMD.

Beide Varianten besitzen eine C-Typ Lektin (CTL)-Domäne (oder Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne, CRD), kurz CLECT-Domäne, in beiden Varianten C-terminal gelegen und 131 aa lang. Das Genprodukt von *CLRC4M* besitzt eine 13 aa lange TMD von aa-Position 47 bis 69, wohingegen diese der Isoform 1 fehlt. CLEC4M und die Isoform 1 stimmen zu 99% überein, mit CD209d zu 90 bzw. 88% (Abbildung 21a).

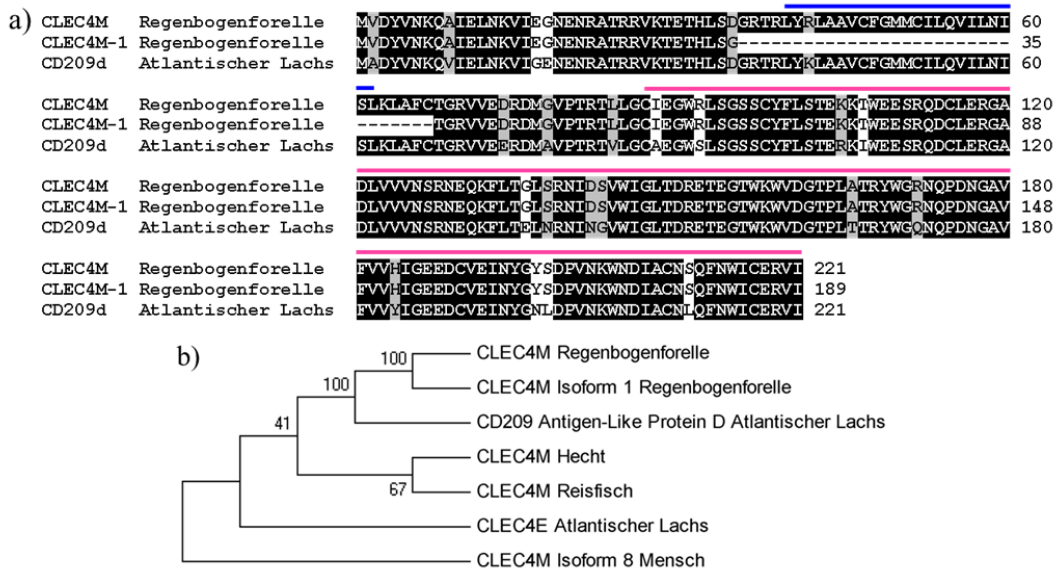

Abbildung 21 Alignment und Stammbaum von CLEC4M.
a) Alignment beider CLEC4M-Proteinsequenz-Isoformen der Regenbogenforelle (Acc-nr. noch nicht zugeteilt) und CD209d vom Atlantischen Lachs (NP_001134518). Identische Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche sind grau unterlegt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 20 entsprechend dargestellt. **b)** Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit folgenden Protein-Sequenzen: CLEC4M/-1 Regenbogenforelle: *Accession*-nr. noch nicht zugeteilt, CD209 Antigen-*Like* Protein D Atlantischer Lachs: NP_001134518, CLEC4M Hecht: ACO13632, CLEC4E Atlantischer Lachs: NP_001140055, Außengruppe: CLEC4M Isoform 8 Mensch, NP_001138382.

Der phylogenetische Stammbaum zeigt ebenfalls die nahe Verwandtschaft der Sequenzen zum Atlantischen Lachs (Abbildung 21b). CLEC4M von Hecht und Reisfisch bilden ein gemeinsames Cluster und zeigen eine entferntere Verwandtschaft. Die CLEC4M-Sequenz des Menschen ist verwandtschaftlich weiter entfernt als die des Lachses und wurde deshalb als Außengruppe verwendet.

Complement Component C1q Receptor-like Protein (CD93)

Der 8.19-fache Transkriptunterschied ($p=3.2x10^{-20}$) von *CD93* ermittelt durch die Microarray-Analyse konnte durch die qRT-PCR im Milzgewebe nicht bestätigt werden, hier wurde eine 0.26-fach ($p=0.038$) höhere Expression im Stamm BORN festgestellt im Vergleich zum Stamm TCO.

CD93 verstärkt als möglicher Rezeptor für C1q und das Mannose-Bindende-Lektin 2 (MBL2) die Phagozytose von Pathogenen. Die mRNA von *CD93* (HE963050) ist 1964 bp lang mit einem ORF von 1518 bp und einem daraus resultierenden Protein bestehend aus 506 aa (CCJ27811). CD93 hat ein Molekulargewicht von 56.4 kDa und einen pI von 5.28. In Abbildung 22 sind die charakteristischen Proteindomänen von CD93 schematisch dargestellt.

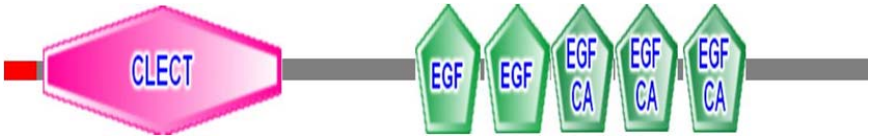

Abbildung 22 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur von CD93.
In Rot dargestellt ist das N-terminale Signalpeptid. Es folgt eine CLECT-Domäne und zwei ‚Epidermal growth factor-like'-Domänen sowie drei *Calcium-binding EGF-like*-Domänen.

Die ersten 17 aa ergeben ein Signalpeptid. Von aa-Position 21 bis 163 folgt eine CLECT-Domäne. Von Position 242 bis 280 und 284 bis 319 schließen sich zwei *Epidermal growth factor-like*-Domänen an. Weiter C-terminal folgen drei *Calcium-binding EGF-like*-Domänen von aa-Position 320 bis 357, 358 bis 396 und 397 bis 435. In Abbildung 23a wurde die Sequenz von C1qR-*Like* Proteins mit einer in der Regenbogenforelle potenziell duplizierten Sequenz verglichen, sie zeigen eine 84%-ige Sequenzübereinstimmung. Das C1qR-*Like* Protein ist 74 aa kürzer. Die Proteindomänen stimmen in beiden Proteinen überein. Im phylogenetischen Stammbaum bilden beide Sequenzen ein Cluster, was eine nahe Verwandtschaft bestätigt (Abbildung 23b). CD93 vom Krallenfrosch zeigt eine nähere Verwandtschaft als homologe Sequenzen der Säuger. Das M6PR-bindende Protein vom Atlantischen Lachs diente als Außengruppe.

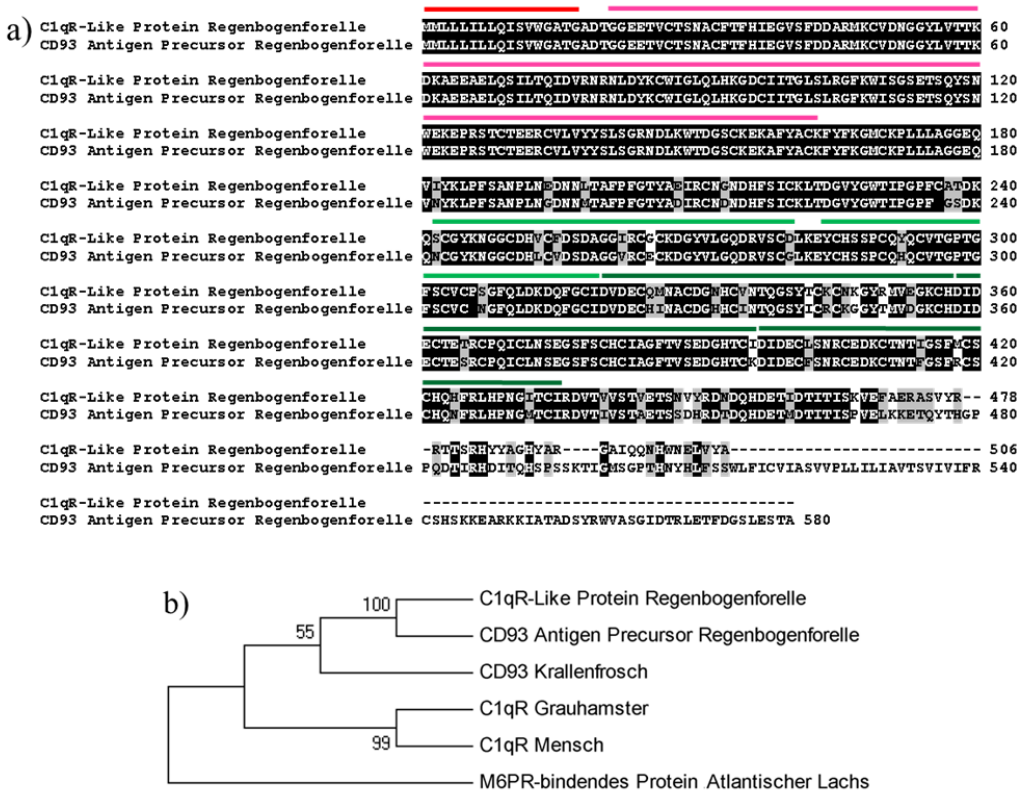

Abbildung 23 Alignment und Stammbaum von CD93.
a) Alignment der C1qR-Like -Proteinsequenzen der Regenbogenforelle (CCJ27811) und CD93 Antigen Precursor ebenfalls aus der Regenbogenforelle (ADD70243). Identische Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche sind grau unterlegt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 22 entsprechend dargestellt. **b)** Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit folgenden Protein-Sequenzen: C1qR-*Like* Regenbogenforelle (CCJ27811), CD93 Antigen Precursor Regenbogenforelle (ADD70243), CD93 Krallenfrosch: ENSXETT00000065985, C1qR Grauhamster: XP_003509923, C1qR Mensch: AAB53110, Außengruppe: Mannose-6-Phosphat Rezeptor (M6PR)-bindendes Protein, NP_001167399

Komplement Faktor D (CFD)

Das Gen kodierend für den Komplement Faktor D wurde mittels Microarray-Analyse als different exprimiert identifiziert. Die geringere Expression im Stamm BORN (FC -3.54, $p=1.35x10^{-7}$) wurde in der qRT-PCR mit einem hochsignifikanten FC von -18.9 ($p= 10^{-6}$) bestätigt. CFD ist eine Schlüsselpeptidase im alternativen Weg des Komplementsystems und schneidet dort den Pathogen- und C3-gebundenen Komplementfaktor B, wodurch ein aktiver Enzymkomplex entsteht, die C3-Konvertase des alternativen Weges. Die mRNA von *CFD* ist 1144 bp lang (NM_001246346), wobei der ORF 759 bp ausmacht. Das hypothetische Protein besteht aus 253 aa (NP_001233275) mit einem Molekulargewicht von 27.2 kDa und einem pI von 8.6. Die typischen Elemente von CFD sind in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

Abbildung 24 Schematische Darstellung der putativen Proteinstruktur von CFD.
In Rot dargestellt ist das N-terminale Signalpeptid. Es folgt eine Trypsin-Like Serin Protease (Tryp_SPc)-Domäne.

Das Protein enthält N-terminal ein Signalpeptid, welches die ersten 22 aa einnimmt. Die Trypsin-Like Serin Protease-Domäne, welche für die Hydrolyse von Peptidbindungen verantwortlich ist. Sie erstreckt sich von aa-Position 29 bis 245 und macht somit fast das gesamte Protein aus. Die CFD-Sequenzen der Regenbogenforelle und des Lachses stimmen in ihrer Sequenz zu 98% überein (Abbildung 25a). Dies wird auch im Stammbaum durch die Clusterbildung beider Sequenzen deutlich (Abbildung 25b). Interessanterweise scheinen die CFD-Sequenzen von Krallenfrosch und Mensch nah verwandt zu sein. Als Außengruppe wurde die Sequenz des Komplementfaktors B (CFB) des Dreistachligen Stichlings verwendet.

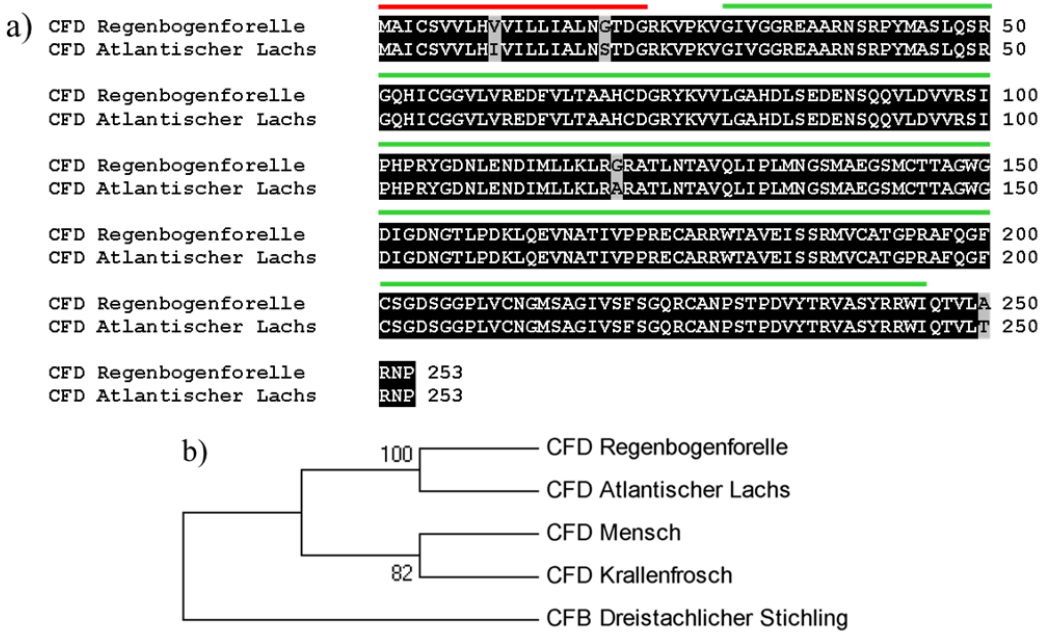

Abbildung 25 Alignment und Stammbaum von CFD.
a) Alignment der CFD-Proteinsequenzen der Regenbogenforelle (NP_001233275) und Atlantischen Lachs (ACI69308). Identische Aminosäurereste sind schwarz, chemisch ähnliche sind grau unterlegt. Die gemeinsamen charakteristischen Domänen sind mit farbigen Balken dem Schema in Abbildung 24 entsprechend dargestellt. **b)** Phylogenetischer Stammbaum, erstellt mit folgenden Protein-Sequenzen: CFD Regenbogenforelle: NP_001233275, CFD Atlantischer Lachs: ACI69308, CFD Mensch: ENST00000327726, CFD Krallenfrosch: NP_989320, Außengruppe: CFB Dreistachliger Stichling, ENSGACT00000027346.

4.3 Untersuchung von Transkriptvarianten mittels reversem *Northern Blot*

Mit der Methode des reversen *Northern Blots* ist es möglich, verschiedene Transkripte eines Gens, z.B. in verschiedenen Geweben, zu detektieren. Ein allen Transkripten gemeinsamer Sequenzbereich diente zur Hybridisierung einer genspezifischen Sonde. Transkripte der Gene *TCBP1* und *CLEC4M* wurden auf diese Weise untersucht, weil deren Amplifizierung und Sequenzierung Hinweise auf gewebespezifische Varianten lieferte.

4.3.1 Nachweis von Transkriptvarianten des *Trout C-Polysaccharide Binding Protein 1*-Gens (*TCBP1*)

Zur Amplifizierung von Transkripten des Gens kodierend für TCBP1 wurden Primer gewählt, die den putativen ORF in gesamter Länge erfassen. Der *Sense*-Primer lag im ersten Exon strangauf vom Startcodon ‚ATG' und der *Antisense*-Primer lag im 3'UTR strangab vom Stopcodon ‚TGA'. Für den 3'-Bereich von *TCBP1*, der allen hier untersuchten Varianten gleich war, wurden *Primer* für ein Fragment gewählt (650 bp), welches innerhalb einer PCR mit DIG-markierten Uridintriphosphaten (UTP) amplifiziert wurde und als Sonde diente.

Es konnten innerhalb dieser Arbeit fünf Transkripte unterschiedlicher Länge, resultierend aus verschiedenen Exonkombinationen, identifiziert werden (Abbildung 26). In Tabelle 3 sind die Amplifikatlängen und Expressionsorte der einzelnen Transkriptvarianten aufgelistet.

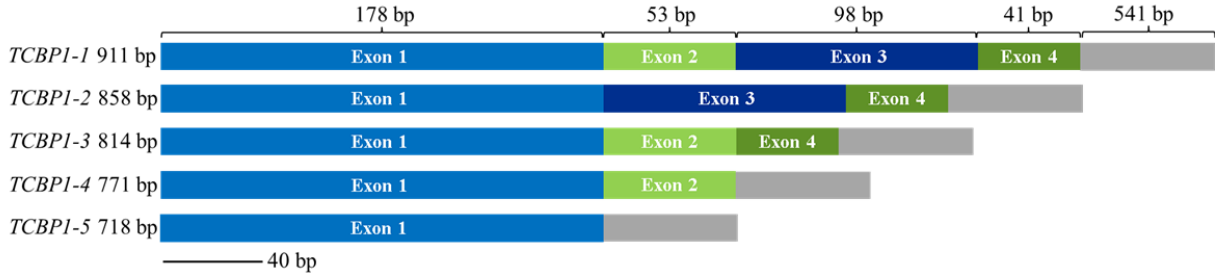

Abbildung 26 Schematische Darstellung der *TCBP1*-Transkriptvarianten 1 bis 5.
Die Darstellung erfolgt im Maßstab 1:40, der graue Bereich ist verkürzt dargestellt.

Tabelle 3 Überblick über die Transkriptvarianten von *TCBP1*.

Tv	mRNA [bp]	ORF [bp]	Protein [aa]	Gewebe mit Genexpression	Amplifikat-länge [bp]	Transkriptlängen-differenz [bp]
1	1059	735	245 (+SP)	Leber, Niere	888	
2	1006	663	221 (+SP)	Milz, Kiemen	835	53
3	962	627	209 (-SP)	Milz	791	44
4	919	597	199 (-SP)	Milz, Kiemen, Leber	750	41
5	866	-	-	Milz, Kiemen, Leber	697	53

SP= Signalpeptid

Die Transkriptvariante 1 ist mit 1059 bp die längste, innerhalb dieser Arbeit identifizierte, Variante, in der die Exons 1 bis 4 enthalten sind (HE974763). Die weiteren Varianten sind entsprechend kürzer, weil jeweils ein oder mehrere Exons fehlen. Die genomische Sequenz des Bereichs strangauf von Exon 1 und die der Introns zwischen dem Exon 1, 2 und 3 wurde bereits aufgeklärt, wodurch die Existenz und Vollständigkeit dieser Exons bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptvariante 5 scheint ein *Nonsense*-Transkript zu sein, weil die *in silico*-Translation dieser Sequenz einen vorzeitigen Abbruch der hypothetischen Proteinstruktur ergab. Nach lediglich zwei Aminosäuren kommt es durch ein TGA zu einem Stopp-Signal. In Abbildung 27 ist die entwickelte Nylonmembran dargestellt, welche die mit Hilfe der Sonde genspezifisch markierten *TCBP1*-Transkripte exemplarisch in der Leber zeigt.

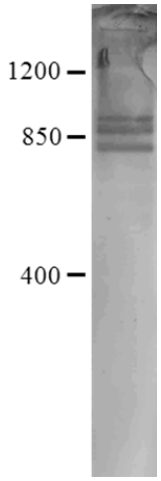

Abbildung 27 Reverser *Northern Blot* des Gens *TCBP1* zum Nachweis von Transkriptvarianten in der Leber gesunder Regenbogenforellen (linienunabhängig).

Es wurden auch in Milz und Kiemen verschieden lange *TCBP1*-Trankripte, resultierend aus einer nested 3'RACE-PCR, genspezifisch detektiert. Zum Nachweis der Sondenfunktionalität und Methodik im Allgemeinen wurde ein 650 bp langes PCR-Produkt, amplifiziert aus Milz-cDNA mit den Sonden-Primern, eingesetzt und ebenfalls detektiert (Anhang D). Getrennt sichtbar waren drei Banden unterschiedlicher Größe. Zwei Banden sind etwas größer als 850 bp und ähnlich lang. Das Bandenmuster scheint für die drei getesteten Gewebe überein zu stimmen, allerdings unterscheidet sich die Dicke der Banden.

4.3.2 Nachweis von Transkriptvarianten des *C-type lectin domain family 4, member M*-Gens (*CLEC4M*)

Zur Amplifizierung von Transkripten des Gens *CLEC4M* wurden Primer gewählt, die einen möglichst großen Bereich des putativen ORFs erfassen. Der *Sense*-Primer lag innerhalb des

ersten Exons, 54 bp strangabwärts vom Startcodon ATG und der *Antisense*-Primer lag im 3'UTR strangabwärts vom PolyA-Signal. Für den 3'-Bereich von *CLEC4M*, der bei den hier untersuchten Varianten gleich war, wurden *Primer* für ein 434 bp-Fragment gewählt, der als Sonde diente. Es konnten zwei verschiedene Transkripte identifiziert werden, die in Milz, Kiemen und Leber exprimiert werden, allerdings unterschiedlich hoch (siehe 4.4). In Abbildung 28 ist die schematische Exonstruktur von *CLEC4M* (oben) und der Transkriptvariante 1 dargestellt, in der Exon 2 fehlt. In untenstehender Tabelle 4 sind die Amplifikatlängen und Expressionsorte der beiden Transkripte aufgelistet.

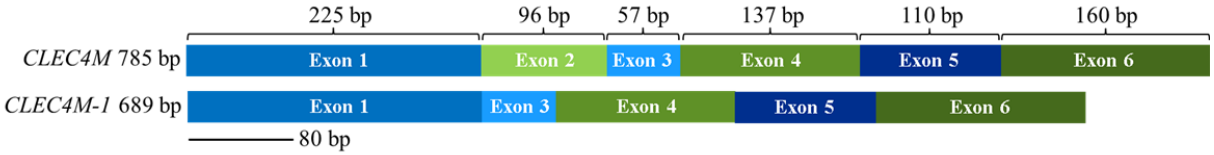

Abbildung 28 Schematische Darstellung der Exons von *CLEC4M* und der Transkriptvariante.
Die Darstellung erfolgte im Maßstab 1:80.

Tabelle 4 Überblick über *CLEC4M* und die Transkriptvariante.

Tv	mRNA [bp]	ORF [bp]	Protein [aa]	Gewebe mit Genexpression	Amplifikat-länge [bp]	Transkriptlängen-different [bp]
CLEC4M	1350	663	221	Milz, Leber, Kiemen, Niere	1171	
CLEC4M-1	1254	567	189	Milz, Leber, Kiemen	1075	96

Die übrigen fünf Exons stimmen in *CLEC4M* und der Transkriptvariante überein. Die Exon/Intron-Grenzen der *CLEC4M*-mRNA wurden durch ein Alignment mit der genomischen *CLEC4M*-Sequenz vom Dreistachligen Stichling (ENSGACT00000025498) aus der ENSEMBL Datenbank bestimmt. Für die Milz, Kiemen und Leber wurden jeweils zwei Fragmente sichtbar in einer Höhe von ca. 1000 bp detektiert (Abbildung 29).

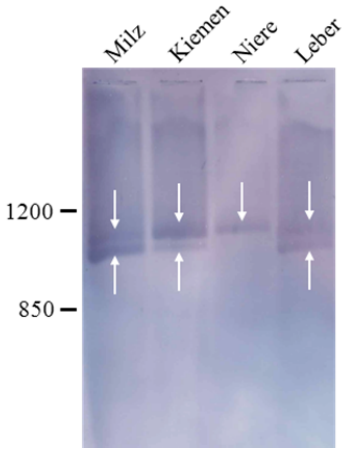

Abbildung 29 Reverser *Northern Blot* des Gens *CLEC4M* zum Nachweis einer Transkriptvariante *CLEC4M-1* in Milz, Kiemen, Niere und Leber gesunder Regenbogenforellen (linienunabhängig).

Die längere (obere) Bande könnte der bereits sequenzierten *CLEC4M*-Sequenz mit einer Größe von 1171 bp entsprechen (HF559225), die kürzere (untere) Bande könnte der Sequenz der Transkriptvariante mit einer Größe von 1075bp entsprechen (HF559226). In der Niere wurde nur das längere der beiden Fragmente, *CLEC4M*, detektiert. Auch durch unsere PCR-Analysen konnte *CLEC4M-1* bisher nicht in der Niere nachgewiesen werden.

4.4 Expressionsanalyse von Komplementgenen in Zellen und Geweben gesunder Regenbogenforellen der Stämme TCO und BORN

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems und wird als eine der ersten Effektorkaskaden im Falle einer Infektion ausgelöst. Das Microarray-Experiment lieferte erste Hinweise auf eine differente Expression von Genen, die dem Komplementsystem zugehörig sind im Milzgewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN (siehe 4.1.3). Nach erfolgreicher Validierung der Expressionsunterschiede (siehe 4.1.4) wurde die Expressionsstärke aller Gene des Komplementsystems und solcher, die zur Aktivierung und Regulation beitragen, insgesamt 37, zunächst im Milzgewebe gesunder Forellen vergleichend bestimmt. Dafür wurden dieselben RNA-Proben verwendet, die bereits im Microarray-Experiment zum Einsatz kamen. Auch Leber und Kiemen spielen eine Rolle bei der Immunabwehr, weshalb auch hier die Grundexpression der Kandidatengene gemessen wurde. Einen ersten Überblick über hoch exprimierte Gene in den Geweben und Zellen bietet Tabelle 5, dort sind jeweils die fünf Gene mit höchster Basisexpression aufgeführt, sortiert nach absteigenden, normierten Kopienzahlen und entsprechender absoluter Kopienzahl (pro 1 µg RNA).

Tabelle 5 Übersicht über die fünf meist exprimierten Gene in Geweben/Zellen gesunder Forellen.

		1	2	3	4	5
	Genname	MBL2	C1q	C6	CD59-1	C7-2
Milz	**rel. Expression (abs. Kopien)**	**17.17** ($8x10^8$)	**1.23** ($2.7x10^7$)	**1.09** ($2.5\ x10^7$)	**0.58** ($1.5\ x10^7$)	**0.49** ($6\ x10^6$)
	Genname	C1q	CLEC14A	MBL2	C1r/C1s	CFD
Kiemen	**rel. Expression (abs. Kopien)**	**0.18** ($6.2x10^6$)	**0.17** ($8.3x10^6$)	**0.14** ($8.4x10^6$)	**0.13** ($4.3x10^6$)	**0.11** ($3.5x10^6$)
	Genname	CD59-1	C9	C5aR	C6	C7-1
RTgill-W1	**rel. Expression (abs. Kopien)**	**0.03** ($1.9x10^6$)	**0.016** ($8.8x10^5$)	**0.015** ($8.4x10^5$)	**0.003** ($1.7x10^5$)	**0.002** ($1.3x10^5$)
	Genname	SERPIN1	TCBP1	C3-3	CFB1	C3-4
Leber	**rel. Expression (abs. Kopien)**	**66.00** ($1.7x10^7$)	**17.43** ($1.7x10^7$)	**13.55** ($7.2x10^6$)	**9.39** ($8.1x10^6$)	**6.07** ($5.6x10^6$)

Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Expressionsdaten beruhen auf *EEF1A1*-normalisierten Kopienzahlen der Gene (relative Expression, siehe 3.2.8.3). Die Kopienzahlen wurden stets mittels eines Standards berechnet (siehe 3.2.8). In den Tabellen sind die Expressionsunterschiede der Gene zwischen den Stämmen, bezogen auf BORN, mit entsprechender Standardabweichung (SEM) aufgeführt.

4.4.1 *in vivo*-Expressionsanalyse von Komplementgenen in der Milz

Neben den Kandidatengenen der Microarray-Analyse befanden sich auch nahezu alle weiteren Gene des Komplementsystems auf einem geringeren Expressionsniveau im Stamm BORN, wenn auch nicht alle signifikant (30/37, Abbildung 30, Tabelle 6).

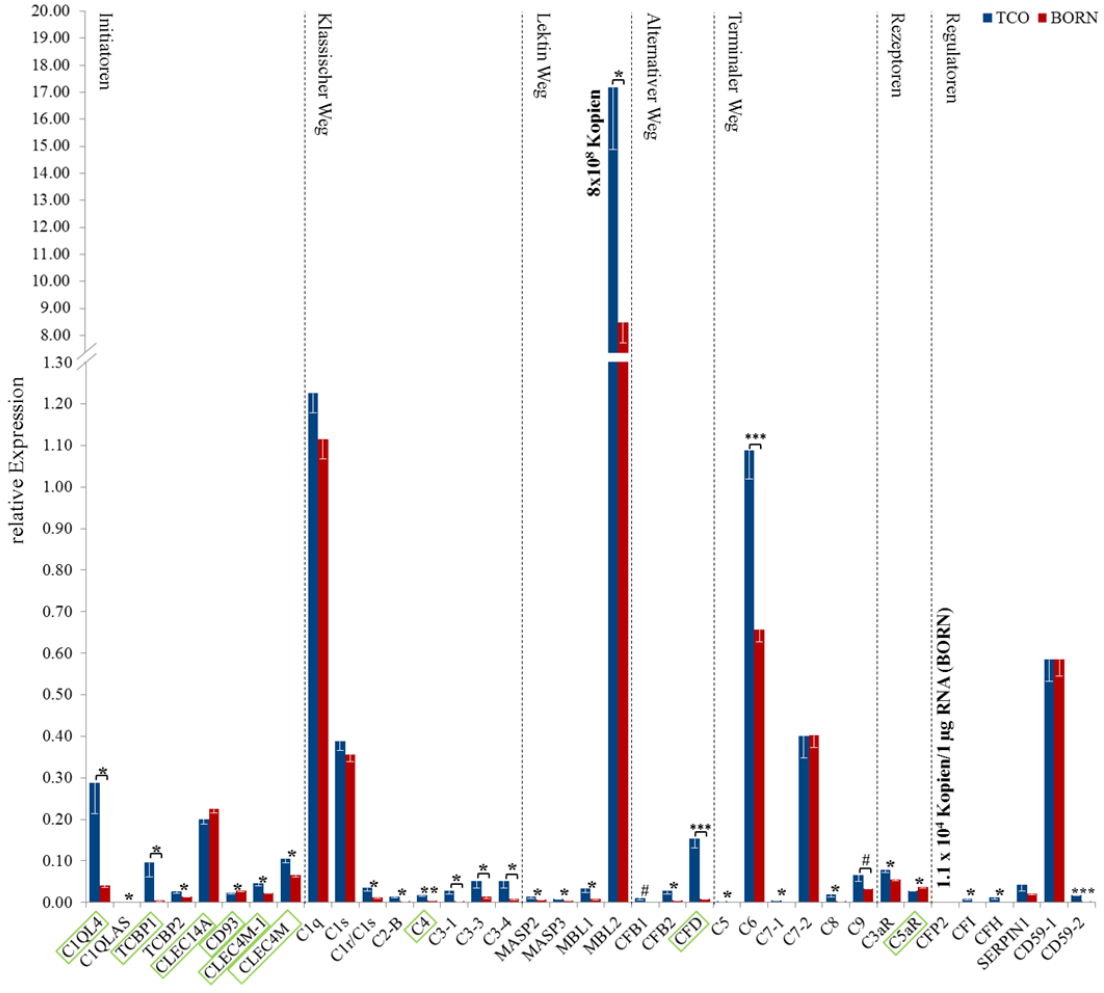

Abbildung 30 Relative Expression der Komplementgene im Milzgewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN ermittelt durch qRT-PCR.
Die Gene sind entsprechend gemeinsamer Wirkpfade innerhalb der Komplementkaskade geordnet. Die durch die Microarray-Analyse identifizierten Kandidatengene sind grün gerahmt. Die Kopienzahlen der Gene mit höchster und niedrigster Basisexpression pro 1 µg RNA sind angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede sind gekennzeichnet: # $p \leq 0.1$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$. Die Messdaten stammen von acht Tieren pro Stamm.

Tabelle 6 Übersicht über Expressionsunterschiede der Komplementgene im Milzgewebe zwischen gesunden TCO- und BORN-Forellen ermittelt durch qRT-PCR.
Der FC gibt das Verhältnis aus BORN/TCO an.

Initiatoren	C1QL4↓	C1QLAS	TCBP1↓	TCBP2	CLEC14A↓	CD93↓	CLEC4M↓	CLEC4M-1↓
FC	**-6.97***	-1.98*	**-22.60***	-2.00*	1.12	1.26*	**-1.60***	**-1.95***
SEM	-1.99	-0.71	-13.44	-0.369	0.08	0.13	-0.19	-0.30
Klassischer Weg	C1q	C1s	C1r/C1s	C2-B	C4↓	C3-1	C3-3	C3-4
FC	-1.10	-1.09	-3.01*	-4.43*	**-3.31****	-12.83*	-3.94*	-5.69*
SEM	-0.06	-0.08	-0.89	-1.64	-0.75	-4.94	-1.84	-2.72
Lektin-Weg	MASP2	MASP3	MBL1	MBL2				
FC	-2.18*	-1.91*	-4.04*	-2.02*				
SEM	-0.87	-0.44	-1.42	-0.33				
Alternativer Weg	CFB1	CFB2	CFD↓					
FC	-9.80#	-4.86*	**-18.88*****					
SEM	-6.49	-1.95	-3.22					
Terminaler Weg	C5	C6	C7-1	C7-2	C8	C9		
FC	-8.12*	-1.66***	-15.62*	1.00	-7.05*	-1.95#		
SEM	-3.54	-0.13	-6.60	0.15	-3.59	-0.47		
Rezeptoren	C3aR	C5aR↓						
FC	-1.40*	1.27*						
SE**M**	-0.13	0.11						
Regulatoren	CFP2	CFI	CFH	SERPIN1	CD59-1	CD59-2		
FC	-4.01	-14.40*	-10.96*	-1.92	-1.00	-6.36***		
SEM	-2.47	-7.64	-5.18	-0.70	-0.11	-0.75		

Die Werte der Transkriptionsunterschiede variierten stark zwischen -1.26-fach (p=0.003) von *C3aR* und -22.6-fach (p=0.02) von *TCBP1*. Neben *TCBP*1 gehören die Gene *CFD* (-18.9-fach, $p=10^{-6}$), *C7*-1 (-15.6-fach, p=0.004), *CFI* (-14.4-fach, p=0.03), *C3-1* (-12.8-fach, p=0.01), *CFH* (-10.9-fach, p=0.03) und *CFB1* (-9.8-fach, p=0.1) zu den Genen mit dem höchsten signifikanten Expressionsunterschied im Stamm BORN. Für die Gene *CFB1* (-9.80-fach, p=0.1), *C9* (-1.95-fach, p=0.06), *CFP2* (-2.32-fach, p=0.08) und *SERPIN1* (-1.92-fach, p=0.2) konnte das geringere Expressionsniveau als marginal signifikant bestimmt werden. Die Gene *C1q* (-1.10-fach), *C1s* (-1.09-fach), *C7-2* (1.00-fach) und *CD59-1* (1.00-fach) befanden sich in beiden Stämmen auf einem annähernd gleichen Expressionsniveau. Nur zwei Gene, *CD93* (1.26-fach, p=0.04) und *C5aR* (1.27-fach, p=0.02), waren höher exprimiert im Stamm BORN.

Auffällig war das sehr stark variierende Expressionsniveau der Gene untereinander. So war das am stärksten exprimierte Gen *MBL2* mit bis zu $8x10^8$ Transkripten in TCO und $4x10^8$ Transkripten/1 µg RNA in BORN vertreten, wohingegen für das am schwächsten exprimierte Gen *CFP2* ca. 4.6 x 10^5 Kopien in TCO und $1.1x10^4$ Kopien/1 µg RNA in BORN bestimmt wurden. *MBL2* war demnach bis zu 36400-fach stärker exprimiert als *CFP2* (im Stamm BORN).

4.4.2 *in vivo*-Expressionsanalyse von Komplementgenen in den Kiemen

Eine quantitative Bestimmung der Komplementgene im Kiemengewebe gesunder Fische wurde durchgeführt. Das Expressionsmuster in den Kiemen unterschied sich deutlich von dem in der Milz (Abbildung 31, vgl. Abbildung 30). Es bestanden weniger Expressionsunterschiede zwischen den Stämmen als in der Milz, auch die Ausprägung vorhandener Expressionsdifferenzen war geringer (Tabelle 7). Zudem waren viele der Expressionsunterschiede nicht signifikant. Das Gen *CFP2* konnte nicht detektiert werden.

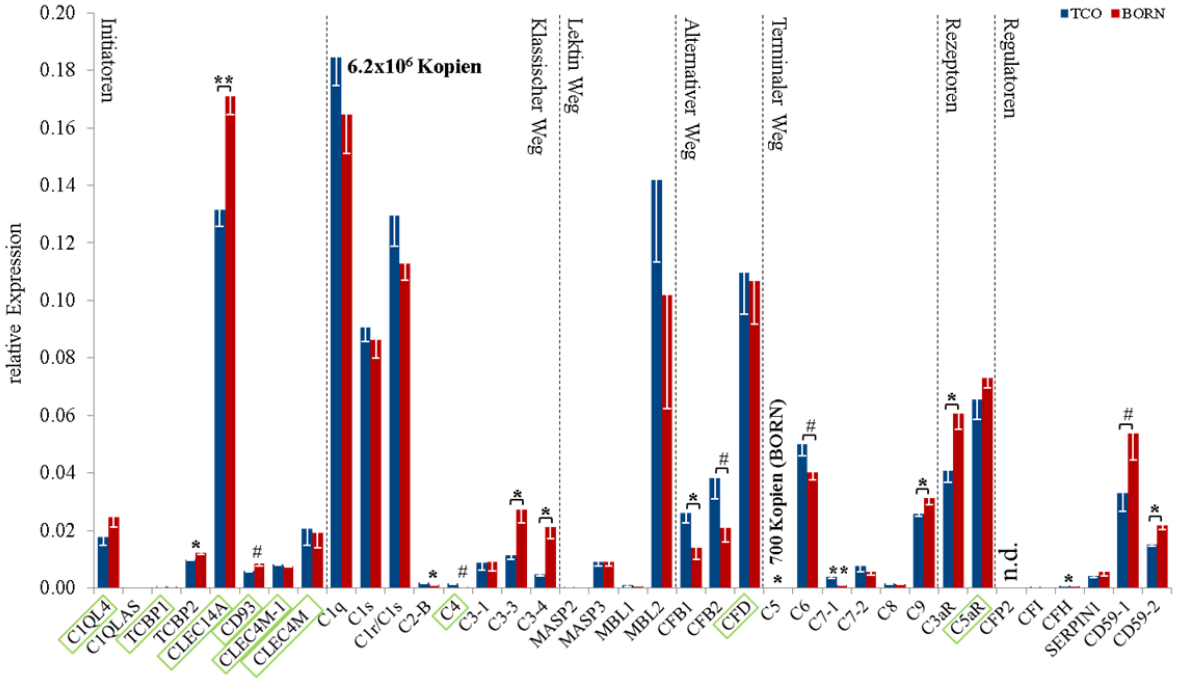

Abbildung 31 Relative Expression der Komplementgene im Kiemengewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN ermittelt durch qRT-PCR.
Die Gene sind entsprechend gemeinsamer Wirkpfade innerhalb der Komplementkaskade geordnet. Die durch die Microarray-Analyse identifizierten Kandidatengene sind grün gerahmt. Die Kopienzahlen derjenigen Gene mit höchster und niedrigster Basisexpression pro 1 µg RNA sind angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede sind folgendermaßen gekennzeichnet:# $p \leq 0.1$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$. Die Messdaten stammen von jeweils acht Tieren pro Stamm. n.d.: nicht detektierbar

Tabelle 7 Übersicht über Expressionsunterschiede der Komplementgene in Kiemengewebe zwischen gesunden TCO- und BORN-Forellen ermittelt durch qRT-PCR.
Der FC gibt das Verhältnis aus BORN/TCO an.

Initiatoren	C1QL4↓	C1QLAS	TCBP1↓	TCBP2	CLEC14A↓	CD93↓	CLEC4M↓	CLEC4M-1↓
FC	1.38	-1.22	-1.52	1.21*	1.30**	1.41#	-1.08	-1.09
SEM	0.29	-0.43	-0.43	0.07	0.07	0.17	-0.42	-0.06
Klassischer Weg	C1q	C1s	C1r/C1s	C2-B	C4↓	C3-1	C3-3	C3-4
FC	-1.12	-1.05	-1.15	-1.49*	-3.77#	1.02	2.42*	4.34*
SEM	-0.11	-0.10	-0.11	-0.19	-1.56	0.45	0.50	1.11
Lektin-Weg	MASP2	MASP3	MBL1	MBL2				
FC	-1.31	-1.00	-1.35	-1.39				
SEM	-0.26	-0.25	-0.66	-0.61				
Alternativer Weg	CFB1	CFB2	CFD↓					
FC	-1.87*	-1.82#	-1.03					
SEM	-0.59	-0.56	-0.20					
Terminaler Weg	C5	C6	C7-1	C7-2	C8	C9		
FC	-4.24*	-1.24#	-3.54	-1.32	-1.17	1.20		
SEM	-1.97	-0.13	-0.64	-0.45	-0.16	0.10		
Rezeptoren	C3aR	C5aR↓						
FC	1.49	1.11						
SEM	0.20	0.13						
Regulatoren	CFP2	CFI	CFH	SERPIN1	CD59-1	CD59-2		
FC	-1.84	-5.17	-1.15	1.30	1.63	1.43		
SEM	-0.84	-3.60	-0.23	0.39	0.42	0.11		

Die in der Milz am stärksten unterschiedlich exprimierten Gene *TCBP1* und *CFD* waren in den Kiemen lediglich moderat bzw. gar nicht different exprimiert. Die Gene *C4* (-3.77-fach, p=0.08), *C5* (-4.24-fach, p=0.005), *C7-1* (-3.53-fach, p=0.0001) und *CFI* (-5.17-fach, p=0.2) zeigten ein ähnlich verringertes Expressionsniveau wie in der Milz, wenn auch nicht immer signifikant. Auf einem höheren Transkriptionsniveau hingegen befanden sich die Gene *CLEC14A* (1.29-fach, p=0.0004) und *CD93* (1.41-fach, p=0.08), die ähnlich stark wie in der Milz ausgelenkt waren. Ebenso zeigten die Gene *C3-3* (2.42-fach, p=0.006), *C3-4* (4.34-fach, p=0.001), *C9* (1.2-fach, p=0.05), *CD59-1* (1.63-fach, p=0.08) und *CD59-2* (1.43-fach, p=0.001) eine erhöhte Expression gegenüber dem Stamm TCO, wohingegen sich diese in der Milz auf einem geringeren Expressionsniveau im Stamm BORN befanden. Der wohl deutlichste Unterschied aber besteht in der Höhe der Grundexpression aller Gene, diese war im Vergleich zur Milz teilweise mehr als 100-fach geringer. Auch zwischen den Genen bestand ein großer Unterschied im Expressionsniveau. So war *C1q* mit ca. 6.2 x 10^6 Kopien/1µg RNA im Stamm TCO am stärksten exprimiert (vgl. Milz: 2.1x10^6 Kopien), wohingegen *C5* mit ca. 700 Kopien/1µg RNA, am geringsten exprimiert wurde.

4.4.3 *in vitro*-Expressionsanalyse ausgewählter Komplementgene in Kiemen-Fibroblastenzellen (Zelllinie RTgill-W1)

Die Zelllinie RTgill-W1 repräsentiert Fibroblastenzellen der Kiemen. Sie wurde zunächst hinsichtlich der Basisexpression von 33 Komplementgenen untersucht. Für die Gene *C1QL4*, *CLEC4M*-1, *CFB2*, *C7-2*, *CFP2* und *CFI* konnten keine Transkripte detektiert werden. Aufgrund dessen wurden diese Gene bei den Stressexperimenten nicht berücksichtigt. *CD59-1* wurde mit 1.9 x10^6 Transkripten/1µg RNA am höchsten exprimiert. Das Gen mit der am niedrigsten detektierten Transkriptzahl war *C4* mit 450 Kopien/1µg RNA. Gene kodierend für die Initiatoren und Proteine des alternativen Wegs wurden insgesamt sehr niedrig exprimiert (Abbildung 32).

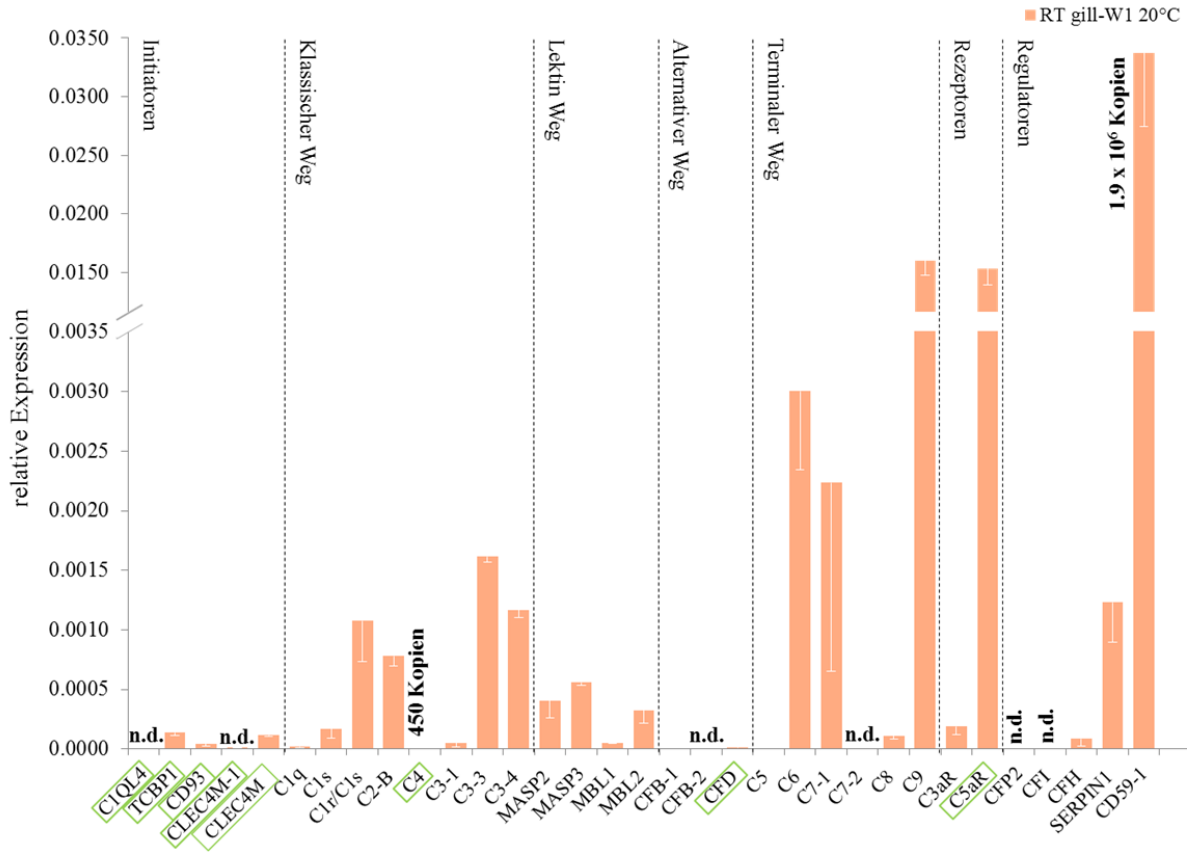

Abbildung 32 Relative Expression der Komplementgene in Kiemen-Fibroblastenzellen der Zelllinie RTgill-W1 bei 20°C ermittelt durch qRT-PCR.
Die Gene sind entsprechend gemeinsamer Wirkpfade innerhalb der Komplementkaskade geordnet. Die durch die Microarray-Analyse identifizierten Kandidatengene sind grün gerahmt. Die Kopienzahlen derjenigen Gene mit höchster und niedrigster Basisexpression pro 1 µg RNA sind angegeben. Sechs Gene konnten nicht detektiert werden (n.d.). Die Messdaten stammen von drei Proben.

4.4.4 *in vivo*-Expressionsanalyse ausgewählter Komplementgene in der Leber

Die Expression ausgewählter Komplementgene wurde in der Leber gesunder Tiere überprüft, da die Leber im Säuger als Hauptsyntheseorgan für Gene des Komplementsystems gilt (Bayne, 2001). Es wurden für jeden Wirkpfad des Komplementsystems repräsentativ Gene gemessen. Die hierfür verwendeten Proben stammen von Tieren, die im Rahmen eines Temperaturexperiments als Kontrolltiere bei 15°C gehalten wurden (Aufzucht wie für Tiere unter 3.2.1 beschrieben). Auffällig waren die geringen, nicht signifikanten Expressionsunterschiede der Gene zwischen beiden Stämmen (Abbildung 33, Tabelle 8).

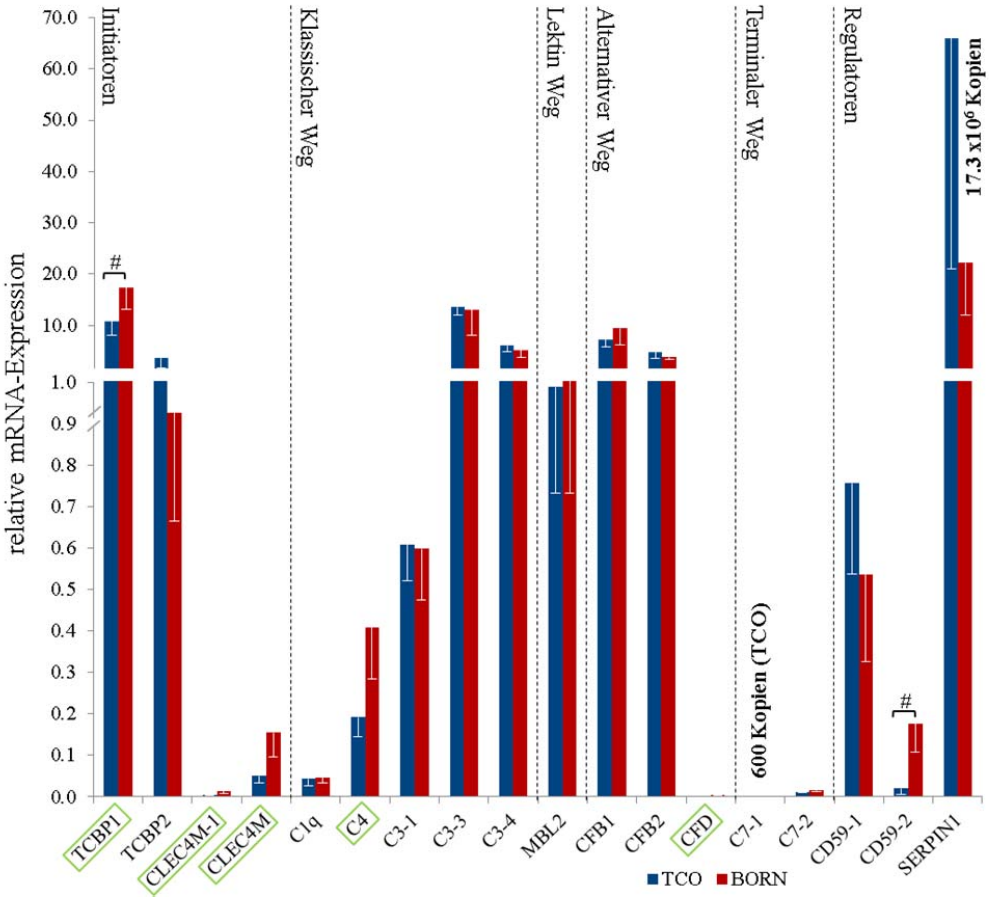

Abbildung 33 Relative Expression der Komplementgene im Lebergewebe gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN ermittelt durch qRT-PCR.
Die Gene sind entsprechend gemeinsamer Wirkpfade innerhalb der Komplementkaskade geordnet. Die durch die Microarray-Analyse identifizierten Kandidatengene sind grün gerahmt. Die Kopienzahlen derjenigen Gene mit höchster und niedrigster Basisexpression pro 1 µg RNA sind angegeben. Signifikante Expressionsunterschiede sind folgendermaßen gekennzeichnet:# $p \leq 0.1$. Die Messdaten stammen von jeweils acht Tieren pro Stamm.

Die größten Unterschiede zeigten die Gene *CD59-2* und *TCBP2* mit einer 7.9-fach höheren bzw. 3-fach geringeren Expression im Stamm BORN. *TCBP1* war im Stamm BORN marginal

signifikant höher exprimiert (0.6-fach). Die höchste Basisexpression zeigte mit ca. $17.3x10^6$ Kopien/1 µg RNA das Gen *SERPIN1* im Stamm TCO. Ebenfalls hohe Expressionen zeigten die Gene *TCBP1* ($16 x10^6$ Kopien/1 µg RNA in BORN) und *C3-3* ($4.4x10^6$ Kopien/1 µg RNA in TCO). *C7-1* war mit 600 Transkripten/1 µg RNA im Stamm TCO das Gen mit der geringsten Expression. Aber auch *CLEC4M-1* war mit 670 Kopien/1 µg RNA im Stamm BORN vergleichsweise gering exprimiert.

Tabelle 8 Übersicht über Expressionsunterschiede der Komplementgene in Lebergewebe zwischen gesunden TCO- und BORN-Forellen ermittelt durch qRT-PCR.
Der FC gibt das Verhältnis aus BORN/TCO an.

Initiatoren	TCBP1↓	TCBP2	CLEC4M↓	CLEC4M-1↓	
FC	**1.60**[#]	-3.98	3.08	3.46	
SEM	0.57	-2.43	1.55	1.81	
Klassischer Weg	C1q	C4	C3-1	C3-3	C3-4
FC	1.08	2.12	-1.02	-1.03	-1.16
SEM	-0.42	0.82	-0.25	-0.41	-0.39
Lektin-Weg	MBL2				
FC	1.32				
SEM	0.68				
Alternativer Weg	CFB1	CFB2	CFD↓		
FC	1.29	-1.27	1.14		
SEM	0.50	-0.38	1.03		
Terminaler Weg	C7-1	C7-2			
FC	1.49	1.41			
SEM	0.37	0.26			
Regulatoren	CD59-1	CD59-2	SERPIN1		
FC	-1.41	**8.89**[#]	-2.97		
SEM	-0.69	7.21	-2.44		

4.5 Expressionsanalyse von Komplementgenen in den Kiemen der Forellenstämme TCO und BORN nach einer *A. salmonicida*-Infektion

Die vergleichende Untersuchung der Expression der Komplementgene in beiden Forellenstämmen im Verlauf einer Infektion mit *A. salmonicida* sollte zum einen Aufschluss darüber geben, wie sich die Gesamtheit der Komplementgene in der Regenbogenforelle verhält und welche Gene möglicherweise eine herausragende Rolle spielen. Zum anderen sollten Hinweise gewonnen werden, inwieweit sich die Expression der einzelnen Gene zeitlich und quantitativ zwischen den Stämmen TCO und BORN unterscheidet. Die gesamten Expressionsdaten aller innerhalb dieser Arbeit gemessenen Gene zu allen Zeitpunkten der Probenahme (0, 6, 12 Stunden, 1, 2, 3, 7, 14 Tage) sind im Anhang E zu finden. In den folgenden Kapiteln wird der Expressionsverlauf repräsentativer Gene für jeden Wirkpfad des

Komplementsystems sowie potenzieller Initiatoren, Regulatoren und Rezeptoren für jeden Zeitpunkt der Probenahme nach der Infektion in den Kiemen, immer im Verhältnis zur Basisexpression der Gene vor Beginn der Infektion (0h-Wert), dargestellt. Nur für ausgewählte Gene erfolgte eine quantitative Messung 14 Tage nach der Infektion. Die Abfolge der Gene richtet sich nach der Aktivierungsreihenfolge innerhalb der Komplementkaskade, wie bereits in den bisherigen Diagrammen des Kapitels 4.4 erfolgt.

4.5.1 Phänotypische Beobachtung der Milz im Infektionsverlauf

Zur Beurteilung des Infektionsgrades der Fische zu jedem der gemessenen Zeitpunkte ist in Abbildung 34 der somatische Index (SI) beider Forellenstämme für die Milz zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion dargestellt. Dieser wurde aus dem Verhältnis des Milzgewichts [mg] zum Gesamtgewicht [g] für jeweils vier Fische pro Zeitpunkt berechnet. Mit zunehmendem Infektionsverlauf schien auch die Milz im Verhältnis zum Fischgewicht zuzunehmen. Zu jedem Zeitpunkt der Infektion bestand ein Unterschied zwischen den Forellenstämmen. Im Stamm TCO bestand zu jedem der gemessenen Zeitpunkte ein signifikant höherer SI im Vergleich zu den gesunden Tieren, nach sieben Tagen hatte die Milz das höchste Gewicht im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht erreicht. Im Stamm BORN war die Milz bereits nach einem und drei Tagen signifikant vergrößert, am stärksten nach drei Tagen. Im Stamm TCO war der SI nach 14 Tagen deutlich geringer als sieben Tage zuvor, allerdings nicht auf dem Ausgangsniveau. Im Stamm BORN wurde lediglich ein geringer Abfall des SI verzeichnet.

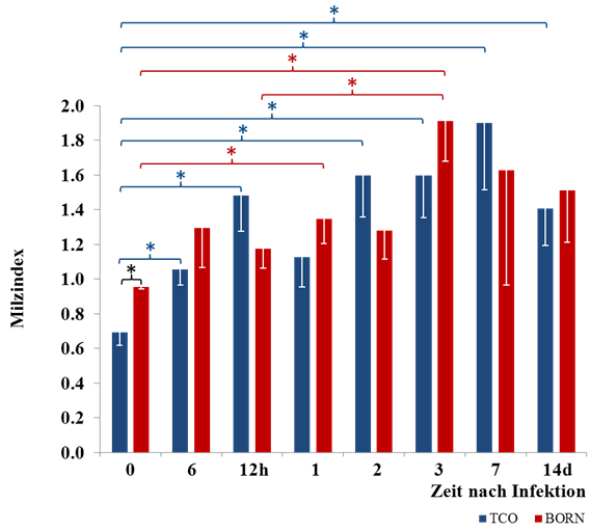

Abbildung 34 Somatischer Index (SI) der Milz beider Forellenstämme zu Beginn und nach der Infektion. Der SI drückt das Verhältnis des Milzanteils am Gesamtfischgewicht aus. Berechnet wurde der SI aus den Werten von vier Tieren pro Zeitpunkt und Stamm.

4.5.2 Expression ausgewählter Komplementgene im Infektionsverlauf

Initiatoren

Das Gen *TCBP1* kodiert für ein Akute-Phase-Protein. Die Expression sank im Stamm TCO im frühen Stadium der Infektion signifikant um das 5.3-fache und stieg allmählich bis zum Tag 7 nach der Infektion auf das 43-fache an, allerdings nicht signifikant (Abbildung 35, Tabelle 9). Nach 14 Tagen war die Expression im Vergleich zu den Kontrollfischen ca. 2.4-fach erniedrigt. Im Stamm BORN sank die Transkription zu Beginn der Infektion um das ca. 14-fache ab und stieg nach drei Tagen gegenüber dem Ausgangsniveau nur leicht an (0.6-fach), wobei diese Unterschiede nicht signifikant waren. Nach 14 Tagen wurde das Ausgangsniveau erreicht.

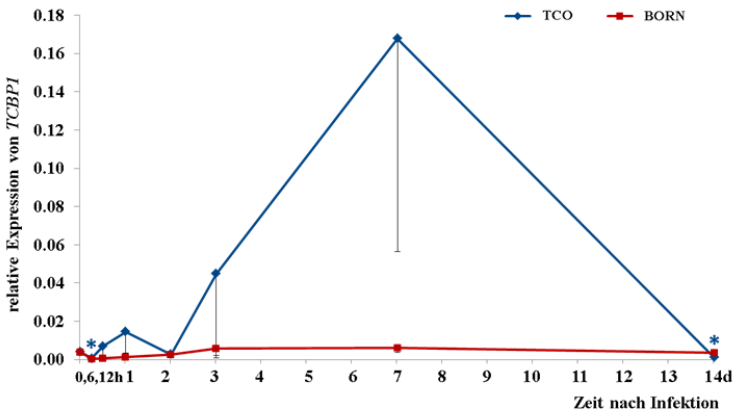

Abbildung 35 Relative Expression des Gens *TCBP1* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
* p≤0.05, n=4

Tabelle 9 Überblick über die Expressionsunterschiede von *TCBP1* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen.

	TCO *TCBP1*		BORN *TCBP1*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	**-6.32***	-2.08	-14.95	-8.41
12h	1.79	1.48	-6.47	-2.97
1d	3.71	2.93	-3.00	-1.75
2d	-1.41	-0.87	-1.49	-0.88
3d	11.52	11.50	1.47	1.13
7d	43.08	29.73	1.59	0.94
14d	**-3.36***	-0.64	-1.11	-0.78

Klassischer Weg

Das Gen *C1r/C1s* kodiert für eine UE der Serinprotease des C1-Komplexes. Während im Stamm TCO eine 0.3-fache Expressionserhöhung nach 12 Stunden erfolgte (Abbildung 36, Tabelle 10) und zu späteren Zeitpunkten eher in der Expression verringert wurde, stieg diese im Stamm BORN nach 12 Stunden marginal signifikant an und blieb erhöht bis drei Tage nach der Infektion.

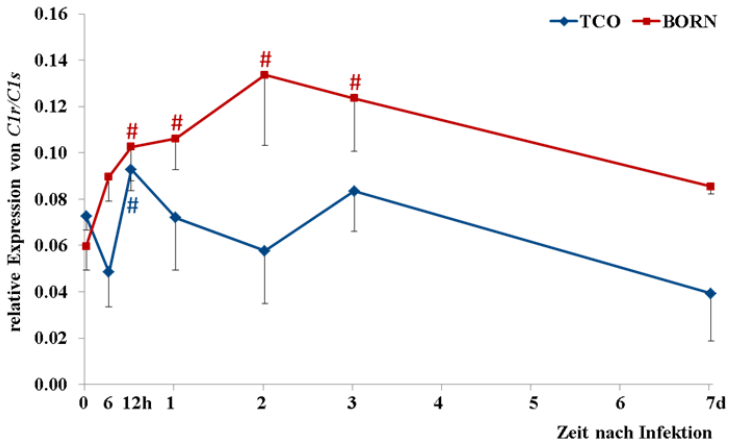

Abbildung 36 Relative Expression des Gens *C1r/C1s* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1, n=4

Tabelle 10 Überblick über die Expressionsunterschiede von C1r/C1s zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen.

	TCO *C1r/C1s*		BORN *C1r/C1s*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	-1.50	-0.48	1.50	0.31
12h	**1.28**$^{\#}$	-0.25	**1.72**$^{\#}$	0.38
1d	-1.01	-0.32	**1.78**$^{\#}$	0.38
2d	-1.26	-0.51	**2.24**$^{\#}$	0.64
3d	1.15	0.26	**2.07**$^{\#}$	0.52
7d	-1.85	-0.98	1.43	0.25

Das Gen *C2-B* kodiert für die im klassischen und Lektin-Weg aktivierte Serinprotease, welche in Folge einer Aktivierung des klassischen Wegs bspw. von der vorher beschriebenen Protease (C1r/C1s) gespalten wird. Im Stamm TCO erfolgte zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine signifikante Veränderung der Genexpression (Abbildung 37, Tabelle 11). Im Stamm BORN wurde das Gen nach zwei und sieben Tagen marginal signifikant aufreguliert (1.3- und 1.4-fach).

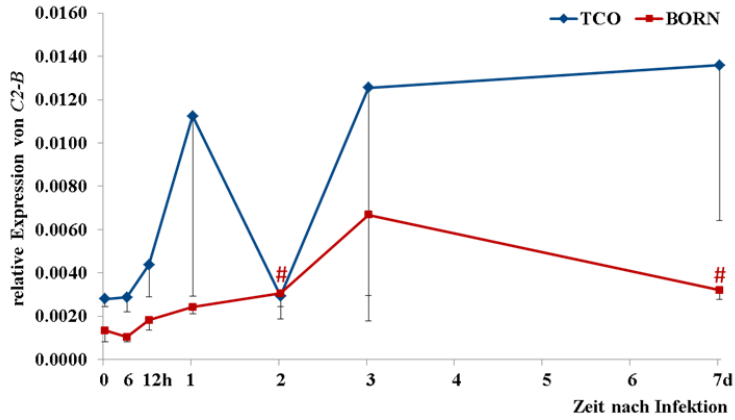

Abbildung 37 Relative Expression des Gens *C2-B* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1, n=4

Tabelle 11 Überblick über die Expressionsunterschiede von *C2-B* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen.

	TCO *C2-B*		BORN *C2-B*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	1.02	0.28	-1.29	-0.57
12h	1.56	0.57	1.35	0.46
1d	4.01	3.01	1.80	0.72
2d	1.05	0.38	**2.28**$^{\#}$	0.98
3d	4.47	3.88	4.97	3.35
7d	4.85	2.64	**2.39**$^{\#}$	0.96

Das Gen *C4* kodiert ebenfalls für eine Komponente, die über den klassischen bzw. Lektin-Weg aktiviert wird. Auffällig war die sehr geringe Grundexpression von *C4* mit nur ca. 1300

Kopien/1µg RNA in beiden Stämmen. Die Expression von *C4* verlief in beiden Stämmen sehr unterschiedlich (Abbildung 38, Tabelle 12).

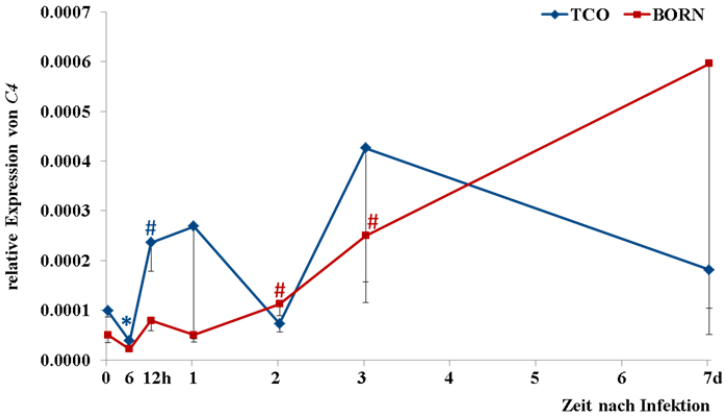

Abbildung 38 Relative Expression des Gens *C4* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1, * p≤0.05, n=4

Tabelle 12 Überblick über die Expressionsunterschiede von *C4* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen.

	TCO *C4*		BORN *C4*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	**-2.56***	-0.43	-2.27	-0.91
12h	**2.39#**	0.66	1.57	0.63
1d	2.72	2.31	1.00	0.37
2d	-1.36	-0.35	**2.23#**	0.83
3d	4.31	3.19	**4.95#**	2.40
7d	1.83	0.81	11.80	11.38

Im Stamm TCO war nach einem signifikanten Absinken nach sechs Stunden ein marginal signifikanter Anstieg der Expression um das 1.4-fache nach 12 Stunden zu verzeichnen. Nach einem, drei und sieben Tagen war diese tendenziell erhöht. Die Expression im Stamm BORN stieg im Verlauf der Infektion allmählich an und erreichte nach zwei und drei Tagen einen marginal signifikant erhöhten Wert (1.2- und 3.9-fach). Nach sieben Tagen war der Höhepunkt mit einem ca. 10.8-fachen Anstieg der Transkription erreicht (nicht signifikant).

In Abbildung 39 ist die Expression der duplizierten Gene *C3-1*, *C3-3* und *C3-4* vergleichend dargestellt, welche für die Schlüsselkomponenten kodieren (Tabelle 13).

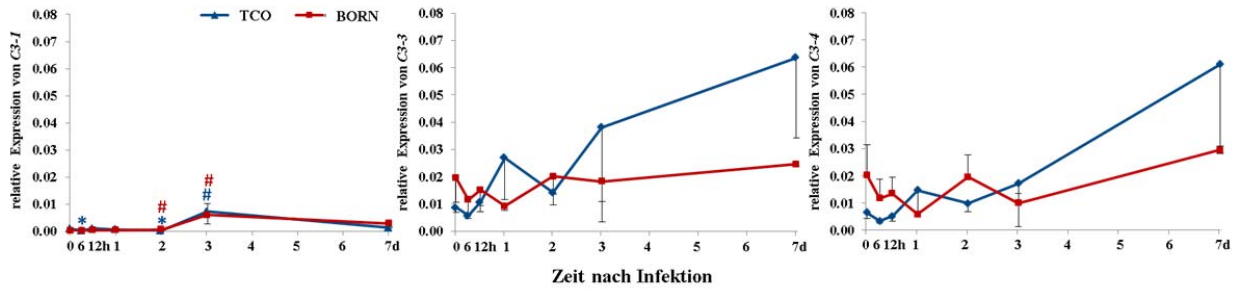

Abbildung 39 Relative Expression der duplizierten Gene *C3-1*, *C3-3* und *C3-4* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1; * p≤0.05, n=4

Tabelle 13 Übersicht über Expressionsunterschiede für *C3-1*, *C3-3* und *C3-4* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten.

	TCO *C3-1*		BORN *C3-1*		TCO *C3-3*		BORN *C3-3*		TCO *C3-4*		BORN *C3-4*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	**-2.91***	-0.56	-1.32	-0.71	-1.55	-0.44	-1.68	-1.10	-1.91	-0.84	-1.74	-1.44
12h	1.10	0.29	1.97	1.24	1.23	0.48	-1.29	-0.76	-1.25	-0.63	-1.51	-1.08
1d	-1.42	-1.01	2.18	1.21	3.10	1.88	-2.14	-1.03	2.30	1.53	-3.45	-2.04
2d	**-2.86***	-0.77	**3.00**$^{\#}$	1.36	1.61	0.61	1.03	0.58	1.54	0.72	-1.03	-0.72
3d	**7.97**$^{\#}$	3.40	**28.35**$^{\#}$	18.64	4.37	4.08	-1.10	-0.67	2.68	2.65	-2.03	-1.34
7d	1.37	0.44	13.58	9.43	7.31	3.71	1.26	0.58	9.58	6.15	1.46	0.82

C3-1 wurde am geringsten exprimiert und stieg nach vorherigem Abfallen drei Tagen stark an, in TCO auf das 7-fache und in BORN auf das 27.4-fache im Vergleich zur Basisexpression. Nach sieben Tagen wurde das Ausgangsniveau in TCO annähernd erreicht, in BORN war die Expression noch 12.6-fach erhöht (nicht signifikant). Für die Gene *C3-3* und *C3-4* hingegen wurde zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine signifikante Expressionsveränderung ermittelt. Tendenziell stieg diese in TCO nach einem Tag leicht und nach sieben Tagen um das 6.3- bzw. 8.6-fache an. Im Stamm BORN schwankte die Expression beider Gene leicht, *C3-3* stieg nicht an, *C3-4* war nach sieben Tagen 0.5-fach erhöht.

Lektin-Weg

Die Gene *MBL1* und *MBL2* kodieren für die Initiatoren des Lektin-Wegs. Die Expression von *MBL1* stieg in beiden Stämmen bereits nach sechs Stunden an (Abbildung 40, Tabelle 14), nach einem Tag war die Transkription 24.7-fach erhöht in TCO (nicht signifikant), in BORN 8-fach, wobei die höchste und signifikante Expression hier nach zwei Tagen vorlag (10.7-fach). Auch nach sieben Tagen war die Transkription in beiden Stämmen nicht auf das Ausgangsniveau zurückgegangen. Die Transkription von *MBL2* stieg im Stamm TCO nach 12 Stunden hoch signifikant um das 1.7-fache an, während in BORN ein signifikanter Anstieg nach 2 Tagen zu verzeichnen war. In beiden Stämmen blieb die Expression ebenfalls nach sieben Tagen erhöht.

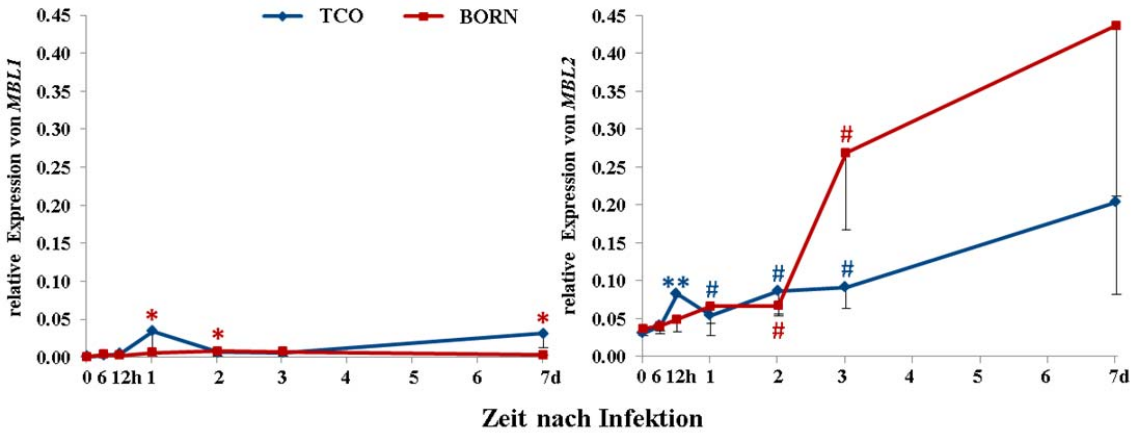

Abbildung 40 Relative Expression der Gene *MBL1* und *MBL2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
Die Messwerte stammen von jeweils vier Tieren. Signifikante Werte sind folgendermaßen gekennzeichnet: # p≤0.1; # p≤0.1; * p≤0.05, n=4

Tabelle 14 Überblick über die Expressionsunterschiede von *MBL1* und *MBL2* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen.

	TCO *MBL1*		BORN *MBL1*		TCO *MBL2*		BORN *MBL2*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	1.75	0.77	5.15	3.74	1.31	0.35	1.09	0.22
12h	3.54	2.07	3.55	3.37	**2.65****	0.29	1.33	0.47
1d	25.69	24.83	**9.04***	2.26	**1.74**$^{\#}$	0.56	1.80	1.07
2d	5.13	3.71	**11.69***	4.27	**2.77**$^{\#}$	1.00	**1.82**$^{\#}$	0.36
3d	4.72	3.87	2.04	1.05	**2.92**$^{\#}$	0.94	**7.29**$^{\#}$	2.95
7d	23.12	14.06	**4.74***	0.99	6.50	3.94	11.84	6.35

Alternativer Weg

Die Genprodukte von *CFB1* und *CFB2* sind dem alternativen Weg des Komplementsystems zuzuordnen und kodieren für Serinproteasen. Für beide Gene konnte zu keinem Zeitpunkt der Infektion ein signifikanter Anstieg der Expression ermittelt werden (Abbildung 41, Tabelle 15). Die Basisexpression von *CFB1* war geringer. *CFB1* sank im Stamm TCO nach sechs Stunden signifikant um das 2.2-fache. Für beide Gene war im Stamm TCO nach drei Tagen ein Transkriptionsanstieg zu verzeichnen, nach sieben Tagen waren die Werte jeweils am höchsten. Die *CFB1*-Expression sank im Stamm BORN zu Beginn der Infektion und stieg nach drei Tagen leicht an. Die *CFB2*-Expression in BORN war zu fast allen Zeitpunkten geringer als das Basisniveau und stieg auch nicht über dieses an.

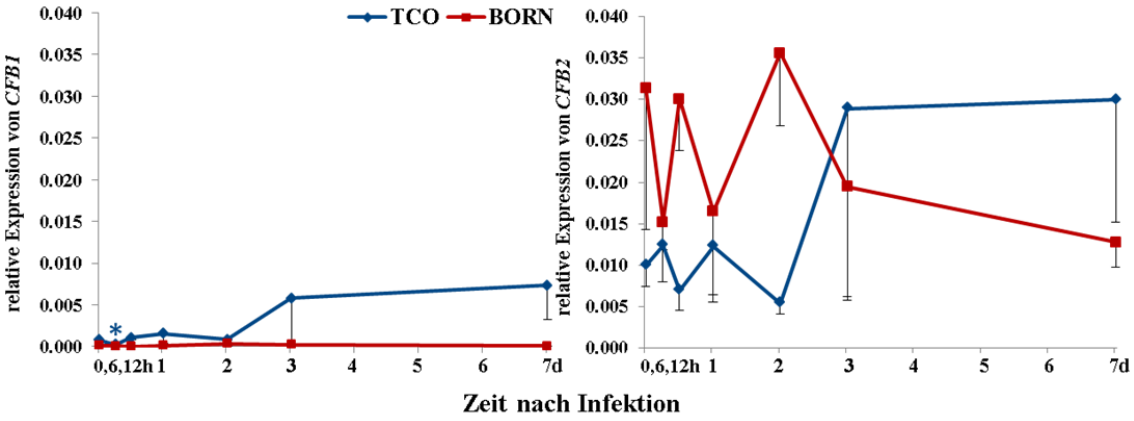

Abbildung 41 Relative Expression der duplizierten Gene *CFB1* und *CFB2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
* p≤0.05, n=4

Tabelle 15 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *CFB1* und *CFB2* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten.

	TCO *CFB1*		BORN *CFB1*		TCO *CFB2*		BORN *CFB2*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	**-3.15***	-0.69	-1.06	-1.16	1.25	0.54	-2.06	-1.21
12h	1.32	0.44	-4.28	-3.85	-1.43	-0.62	-1.04	-0.32
1d	1.94	1.52	1.23	1.33	1.24	0.67	-1.91	-1.27
2d	1.02	0.43	3.36	3.79	-1.83	-0.79	1.14	0.28
3d	7.17	6.95	2.08	1.72	2.91	2.45	-1.61	-1.40
7d	9.01	5.27	-1.58	-1.76	3.02	1.68	-2.46	-1.46

CFD kodiert für die Serinprotease im alternativen Weg, die CFB schneidet und so zur Bildung der C3-Konvertase beiträgt.

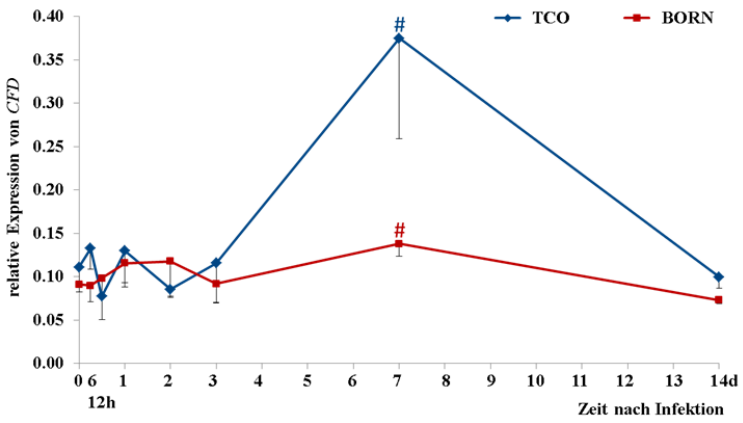

Abbildung 42 Relative Expression des Gens *CFD* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1, n=4

Tabelle 16 Überblick über die Expressionsunterschiede von *CFD* zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion in beiden Forellenstämmen.

	TCO *CFD*		BORN *CFD*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	1.20	0.38	-1.02	-0.23
12h	-1.44	-0.62	1.08	0.24
1d	1.17	0.48	1.27	0.27
2d	-1.30	-0.36	1.29	0.46
3d	1.04	0.49	1.01	0.25
7d	**3.38**$^{\#}$	1.36	**1.51**$^{\#}$	0.22
14d	-1.12	-0.32	-1.25	-0.14

In beiden Forellenstämmen erfolgte eine marginal signifikante Erhöhung der Transkription von *CFD* nach sieben Tagen, im Stamm TCO 2.4-fach, im Stamm BORN 0.5-fach (Abbildung 42, Tabelle 16). Nach 14 Tagen befand sich die Expression in beiden Stämmen wieder auf dem Ausgangsniveau.

Terminaler Weg

Der Transkriptionsverlauf der Gene *C7-1* und *C7-2*, welche für Komponenten des Membranangriffskomplexes kodieren, verlief, unabhängig vom Forellenstamm, sehr unterschiedlich (Abbildung 43, Tabelle 17).

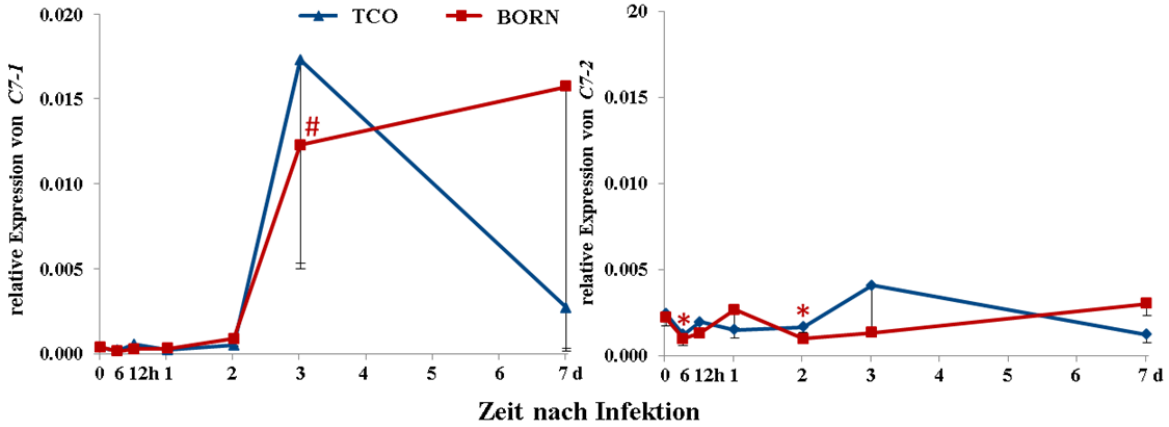

Abbildung 43 Relative Expression der duplizierten Gene *C7-1* und *C7-2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1; * p≤0.05, n=4

Tabelle 17 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *C7-1* und *C7-2* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten.

	TCO *C7-1*		BORN *C7-1*		TCO *C7-2*		BORN *C7-2*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	-1.88	-0.83	-2.76	-1.03	-1.98	-1.24	**-2.28***	-0.30
12h	1.63	0.66	-1.37	-0.65	-1.25	-0.39	-1.70	-0.32
1d	-1.57	-0.44	-1.31	-0.53	-1.64	-0.71	1.21	0.49
2d	1.41	0.34	2.38	1.37	-1.48	-0.52	**-2.28***	-0.39
3d	51.05	37.58	**33.00**$^{\#}$	21.33	1.67	1.19	-1.65	-0.41
7d	7.98	7.63	42.26	43.48	-2.00	-0.98	1.37	0.36

Die Grundexpression von *C7-2* war 6- bzw. 5-fach höher in den Stämmen TCO und BORN als die von *C7-1*. Die *C7-1*-Expression stieg in beiden Stämmen nach drei Tagen stark an, in TCO um das 50-fache (nicht signifikant), im Stamm BORN marginal signifikant um das 32-fache, wobei diese nach sieben Tagen noch weiter auf das 41-fache anstieg. Die Expression im Stamm

TCO sank nach sieben Tagen auf das 7-fache im Vergleich zum Ausgangsniveau. Die *C7-2*-Expression in TCO war am dritten Tag leicht erhöht (0.6-fach) und befand sich nach 7 Tagen auf einem 1.0-fach geringeren Niveau als zu Beginn der Infektion. Die *C7-2*-Expression im Stamm BORN hingegen sank nach sechs Stunden und zwei Tagen signifikant ab (1.3-fach) und stieg nach sieben Tagen nur leicht an im Vergleich zum Beginn der Infektion.

Regulatoren

Das Gen *CFI* kodiert für einen negativen Regulator von C3, *CFH* kodiert für den Ko-Faktor. Sechs Stunden nach der Infektion konnten für *CFI* keine Daten ermittelt werden. Die *CFI*-Expression zeigte im Stamm TCO Aufregulationen ab 12 Stunden nach der Infektion, welche jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant war (Abbildung 44, Tabelle 18).

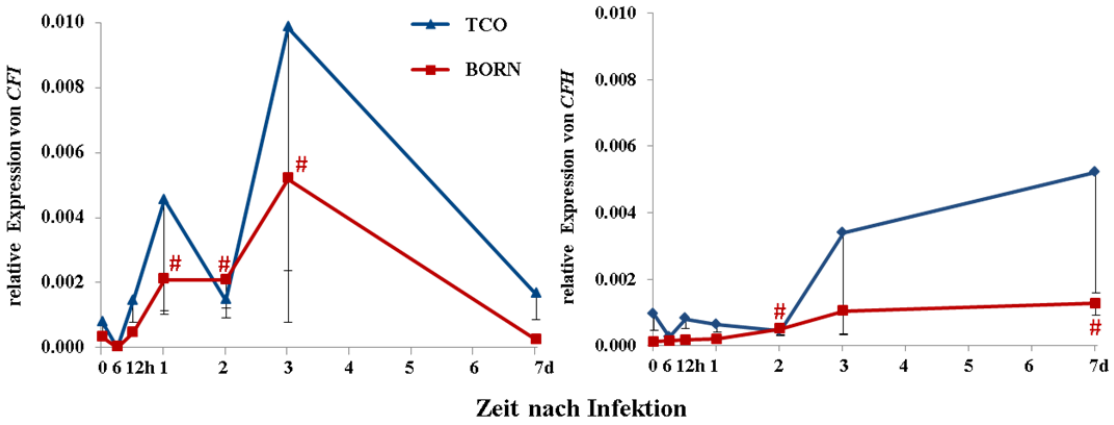

Abbildung 44 Relative Expression der Gene *CFI* und *CFH* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1, n=4

Tabelle 18 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *CFI* und *CFH* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten.

	TCO *CFI*		BORN *CFI*		TCO *CFH*		BORN *CFH*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	-	-	-	-	-3.64	-2.17	1.23	0.78
12h	1.84	1.07	1.44	0.59	-1.17	-0.57	1.54	1.00
1d	5.80	4.83	**6.67**$^{\#}$	3.94	-1.49	-0.54	1.77	1.16
2d	1.86	0.97	**6.61**$^{\#}$	3.40	-2.13	-1.24	**4.36**$^{\#}$	2.77
3d	12.58	12.44	**16.57**$^{\#}$	10.29	3.62	3.72	9.11	7.13
7d	2.11	1.26	-1.36	-0.50	5.55	4.77	**11.03**$^{\#}$	5.09

Im Stamm BORN erfolgte nach einem, zwei und drei Tagen eine starke, marginal signifikante Aufregulation der Genexpression, nach drei Tagen sogar fast 16-fach. Das Gen *CFH* wurde

ebenfalls im Stamm BORN nach zwei sowie nach sieben Tagen in seiner Expression marginal signifikant erhöht, während in TCO nach drei und sieben Tagen lediglich ein tendenzieller Anstieg der Expression zu verzeichnen war.

CD59-1 und *CD59-2* kodieren für negative Regulatoren des terminalen Wegs der Komplementkaskade. Die Basisexpression vor der Infektion und der Expressionsverlauf beider Gene war ähnlich (Abbildung 45, Tabelle 19).

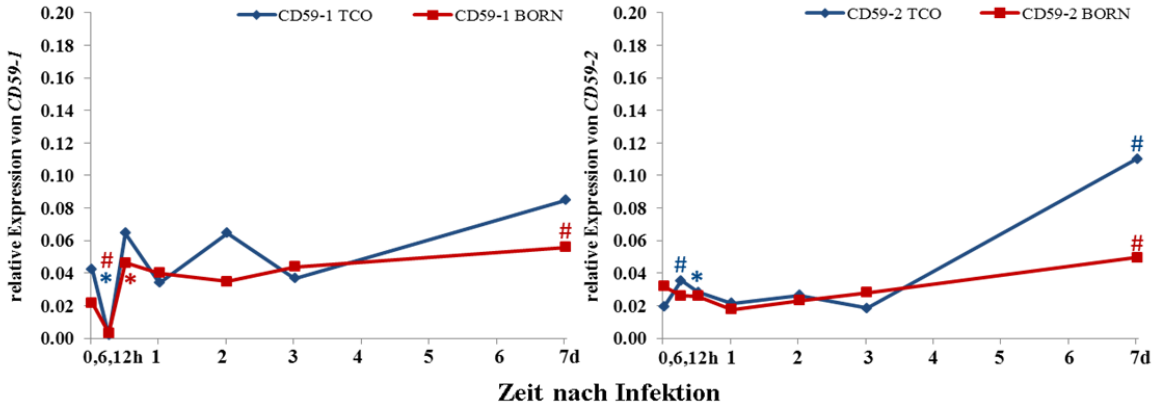

Abbildung 45 Relative Expression der duplizierten Gene *CD59-1* und *CD59-2* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1; * p≤0.05, n=4

Tabelle 19 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *CD59-1* und *CD59-2* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten.

	TCO *CD59-1*		BORN *CD59-1*		TCO *CD59-2*		BORN *CD59-2*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	**-22.27***	-5.97	**-6.90#**	-2.22	**1.83#**	0.40	-1.22	-0.46
12h	1.53	0.33	**2.14***	0.29	**1.46***	0.18	-1.23	-0.35
1d	-1.25	-0.27	1.85	1.02	1.11	0.38	-1.82	-0.54
2d	1.52	0.73	1.61	0.59	1.36	0.38	-1.38	-0.24
3d	-1.16	-0.37	2.02	0.87	-1.04	-0.25	-1.14	-0.46
7d	2.00	0.83	**2.59#**	0.98	**5.70#**	2.40	**1.55#**	0.44

Die *CD59-1*-Expression sank nach sechs Stunden in beiden Stämmen stark ab (21-/6-fach). Eine signifikante Erhöhung der Expression fand im weiteren Verlauf in TCO nicht statt, in BORN verdoppelte sich die Expression nach 12 Stunden signifikant und blieb auch nach sieben Tagen 1.6-fach erhöht. Die *CD59-2*-Expression stieg in TCO nach sechs und 12 Stunden signifikant leicht an und war am siebten Tag der Infektion 4.7-fach erhöht. In BORN erfolgte nach sieben Tagen ein 0.6-facher Transkriptionsanstieg.

Rezeptoren

C3aR kodiert für einen Anaphylatoxinrezeptor des Komplementsystems. Im Stamm TCO zeigte das Gen nach zwei und sieben Tagen eine mäßige, marginal signifikante Aufregulation (Abbildung 46, Tabelle 20). In den BORN-Forellen war das Gen zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant bzw. marginal signifikant in seiner Expression erhöht. Nach zwei Tagen wurde die höchste Expression (1.2-fach) erreicht. Beachtlich war vor allem die Kopienzahlverdopplung von $5x10^5$ Kopien/1µg RNA auf ca. 1.4 Mio. Kopien im Stamm BORN.

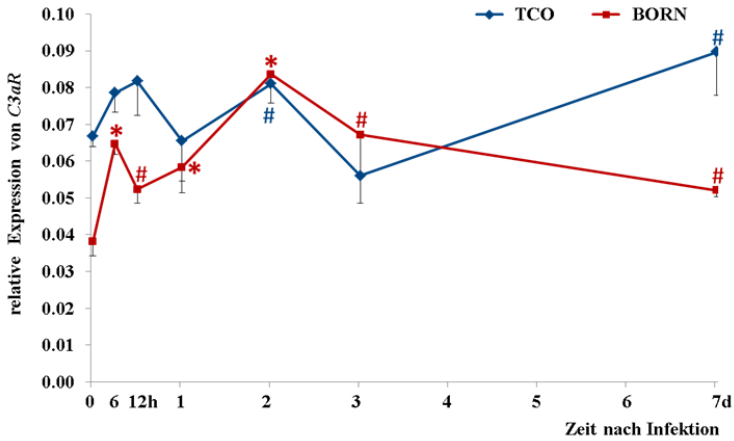

Abbildung 46 Relative Expression des Gens *C3aR* in Kiemengewebe nach einer *A. salmonicida*-Infektion in den Stämmen TCO und BORN.
p≤0.1; * p≤0.05, n=4

Tabelle 20 Übersicht über die Expressionsunterschiede von *C3aR* in beiden Stämmen zu den einzelnen Zeitpunkten.

	TCO *C3aR*		BORN *C3aR*	
t	**FC**	**SEM**	**FC**	**SEM**
6 h	1.18	0.09	**1.70***	0.19
12h	1.22	0.16	**1.37#**	0.11
1d	-1.02	-0.22	**1.53***	0.10
2d	**1.21#**	0.09	**2.19***	0.31
3d	-1.19	-0.17	**1.76#**	0.34
7d	**1.34#**	0.19	**1.36#**	0.15

4.6 Expressionsanalyse von Komplementgenen in Kiemen-Fibroblasten nach einer *A. salmonicida*-Stimulation

Die Expression ausgewählter Kandidatengene wurde im Zellmodell mit Kiemen-Fibroblastenzellen der Zelllinie RTgill-W1 nach einer 24-stündigen Stimulation mit inaktivierten *A. salmonicida* ($1x10^4$) untersucht (Abbildung 47, Tabelle 21). Eine vergleichsweise hohe Ausgangsexpression zeigten die Gene *C9*, *C5aR* und *CD59-1*, wobei letzteres mit $1.9x10^6$ Kopien pro 1 µg RNA eine ca. 4000-fach höhere Expression als das am geringsten exprimierte Gen *C4* zeigte mit 450 Kopien (siehe Abbildung 32). *C7-1*, *C3-3* und *MASP2* zeigten eine mäßig hohe Expression. *TCBP1*, *CLEC4M-1*, *C1q* und *CFD* hingegen waren neben *C4* ebenfalls sehr gering exprimiert. Nach der Stimulation zeigten die Gene mit geringem Expressionsniveau jedoch eine starke signifikante Erhöhung, im Falle von *TCBP1* und *C4* über 200-fach. Die

Expression von *C7-1*, *C9* und *CD59-1* war nach 24h hingegen auf ein geringeres Niveau als vor der Stimulation gesunken.

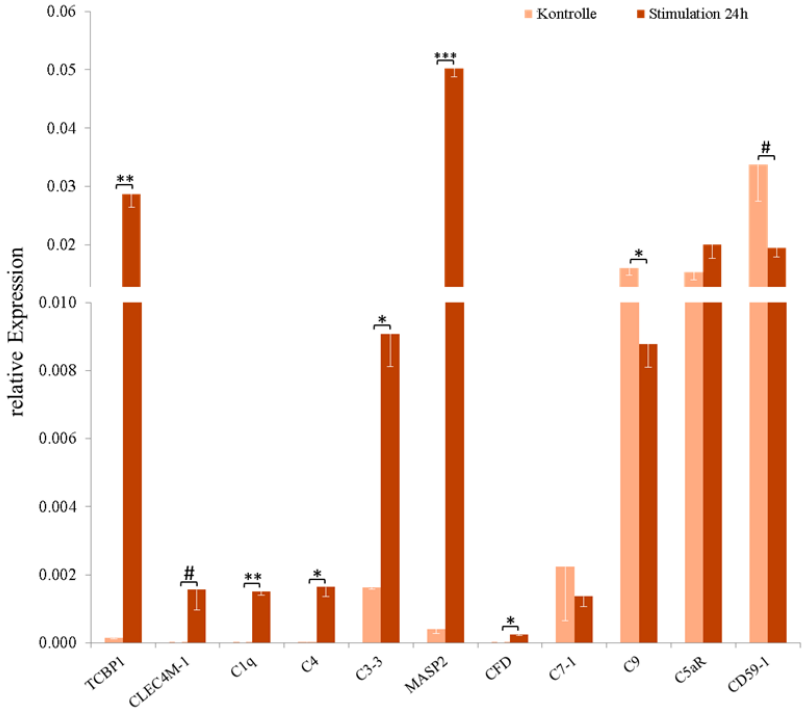

Abbildung 47 Relative Expression ausgewählter Komplementgene in Kiemen-Fibroblastenzellen der Zelllinie RTgill-W1 nach einer 24 stündigen Stimulation mit attenuierten *A. salmonicida* (1x10^4).
* p≤0.05, ** p≤0.001; *** p≤0.0001, n=3

Tabelle 21 Überblick über die Expressionsunterschiede der Gene nach einer Stimulation mit *A. salmonicida* nach 24h.

Initiatoren	TCBP1	CLEC4M-1	
FC	**208.64****	**107.77**$^{\#}$	
SEM	35.35	57.27	
Klassischer Weg	C1q	C4	C3-3
FC	**76.03****	**204.26***	**5.62***
SEM	34.56	111.08	0.62
Lektin-Weg	MASP2		
FC	**123.40*****		
SEM	43.55		
Alternativer Weg	CFD		
FC	**21.96***		
SEM	11.96		
Terminaler Weg	C7-1	C9	
FC	-1.64	**-1.82***	
SEM	-1.22	-0.20	
Rezeptoren	C5aR		
FC	1.31		
SEM	0.19		
Regulatoren	CD59-1		
FC	**-1.73**$^{\#}$		
SEM	-0.35		

5. DISKUSSION

5.1 Geringere Expression zahlreicher Gene im Stamm BORN

Der Vergleich der Milztranskriptome beider Regenbogenforellenstämme im Grundzustand Zustand ergab 807 different exprimierte Gene mit einem Expressionsunterschied von ≥ 1.5 (p=0.0001), wobei 802 Gene im Regenbogenforellenstamm BORN geringer exprimiert waren als im Stamm TCO. 200 dieser Gene, mit einem Expressionsunterschied von ≥ 3, und zusätzlich 27 immunrelevante Gene mit einem Expressionsunterschied von ≥ 1.5 wurden näheren Analysen unterzogen. Das Programm *GO Term Mapper* sortierte die Gene entsprechend gemeinsamer Funktionen. Die meisten Gene sind in grundlegende Bioprozesse involviert wie bspw. ‚Transport', ‚Organisation des Zytoskeletts' und ‚Regulation des Zellzyklus'. Aufgrund des hohen Anteils an immunrelevantem Gewebe in der Milz (Fänge und Nilsson, 1985) war es überraschend, dass die meisten der different exprimierten Gene eben nicht an immunrelevanten Prozessen beteiligt waren. Es bestand also eher ein großer Unterschied in der Ausprägung von Genen, die an grundlegenden Stoffwechselprozessen in der Milz beteiligt waren. Da ein geringeres Transkriptionsniveau für zahlreiche Gene verschiedenster Funktionen im Stamm BORN in der Milz nachgewiesen wurde, ist anzunehmen, dass die BORN- im Gegensatz zu den TCO-Forellen ein generell niedrigeres Energieniveau für die Aufrechterhaltung der Vorgänge in der Milz benötigen und so mglw. Energie sparen. Die Transkription von Genen ist ein komplexer Mechanismus, dessen zahlreiche Einzelschritte energetisch sehr aufwendig sind. Die Bildung der prä-mRNA erfordert die Synthese und Rekrutierung einer Vielzahl an Transkriptions- und Initiationsfaktoren sowie *Enhancer*- und *Silencer*-Molekülen. Energieaufwendig sind auch das anschließende Anhängen einer 5'-Kappe, das Spleißen der prä-mRNA, die Polyadenylierung und letztendlich der Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma (Rolfe und Brown, 1997). Um diese Energie zu sparen, reduzieren Säugetiere bspw. sowohl Transkription als auch Translation auf ein Minimum während ihres Winterschlafs (van Breukelen und Martin, 2002). Inwieweit es ähnliche Mechanismen der Energieeinsparung auch bei Fischen gibt ist unklar und auch ob derart gesparte Energie einen positiven Effekt auf die Robustheit der BORN-Forellen gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren haben könnte. Die Lebensbedingungen des Brackwassers führten zu einer generell höheren Robustheit des Stamms BORN sowie zu einer geringeren Anfälligkeit gegenüber dem Fischpathogen *A. salmonicida*, wie Korytář *et al.* 2009 zeigten. Ebenso wurde eine gleichbleibende Gewichtszunahme der BORN-Forellen nach

Temperaturstress im Vergleich zu Regenbogenforellen des Stamms TCO beobachtet, welche in ihrem Wachstum stagnierten (Rebl *et al*., 2013). Es liegt die Vermutung nahe, dass die BORN-Forellen mglw. durch die energiesparende Transkriptomaktivität im gesunden Grundzustand ein erhöhtes Potenzial für eine stärkere Hochregulierung immunrelevanter Gene nach Stresseinwirkung besitzen.

Von den über die Microarray-Experimente als different exprimiert erfassten, immunrelevanten Genen wurden insgesamt 13 Kandidatengene des angeborenen Immunsystems zur Expressionsvalidierung ausgewählt. Für sieben dieser Gene wurde mittels qRT-PCR die microarrayspezifisch geringere Expression im Stamm BORN bestätigt. Die Expressions-validierung der immunrelevanten Kandidatengene der Microarray-Analyse und daraus abgeleiteten Komplementgene im Milzgewebe gesunder Forellen ergab ebenfalls ein geringeres Expressionsniveau fast aller Gene im Stamm BORN, für keines der Gene wurde eine signifikant höhere Expression in den BORN-Forellen ermittelt. Dies kann als Bestätigung der Ergebnisse der Microarray-Analyse gewertet werden.

Die differente Expression konnte allerdings nicht für alle ausgewählten Kandidatengene bestätigt werden. Für die Microarray-Analyse kam der 16K-GRASP-Microarray zum Einsatz (Schalburg *et al*., 2005). Dieser besteht aus insgesamt 16.006 gespotteten cDNAs verschiedener Salmoniden-Arten. Den Hauptteil machten mit 83.9% 13.421 cDNA-Sequenzen des Atlantischen Lachses (*Salmo salar*) und mit 16.1% 2.576 cDNA-Sequenzen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) aus. Zudem wurden Sequenzen verschiedenster Gewebe und Entwicklungsstadien auf dem Microarray vereint, um ein möglichst großes Spektrum an Genen bereitzustellen. Über das Geschlecht der Tiere gibt es keine Angaben. 55.8% der cDNAs auf dem Microarray wurden bisher annotiert, mit 44.2% der cDNAs war aber fast die Hälfte noch unbekannt (*Unknowns*). Somit wurden vermutlich nicht alle different exprimierten (immunnrelevanten) Gene identifiziert. Ungenaue Bindungen der untersuchten cDNAs der Forelle an die Lachs-cDNAs auf dem Microarray könnten zu falsch-positiven/negativen Ergebnissen geführt haben. Eine genaue Übereinstimmung der Expressionsunterschiede der Microarray-Analyse und der Validierung wurde möglicherweise nicht erzielt, weil eine schnelle Sättigung der Spots mit cDNA auf dem Microarray erreicht wurde, wodurch eine Erfassung der real existierenden cDNA-Menge nicht erfolgen konnte. Zudem gab es im gemeinsamen Vorläufer der Salmoniden (vor 25-100 Millionen Jahren) noch eine zusätzliche Genomduplikation im Vergleich zu den Knochenfischen, weshalb viele Gene dupliziert im pseudotetraploiden Genom der Regenbogenforelle vorliegen

(Koop, 2008). Als Beispiel können hier die duplizierten *TLR22*-Gene genannt werden, welche aufgrund weniger Basenaustausche auf cDNA-Ebene nur schwer unterscheidbar sind (Rebl *et al.*, 2007). Da durch die auf dem Microarray befindlichen Sequenzen nicht alle duplizierten Gene unterschieden werden konnten, wurden mglw. andere Genvarianten mittels qRT-PCR untersucht als die auf dem Microarray befindlichen Sequenzen. Auch Transkriptvarianten könnten eine korrekte Bindung und Identifizierung zusätzlich erschwert haben.

5.2 Sequenzaufklärung von acht neuen Immungenen in der Regenbogenforelle

Innerhalb dieser Arbeit gelang die Sequenzaufklärung und -analyse der bisher in der Regenbogenforelle unbekannten Immungene *ST2L*, *IRAK3*, *MARCH3*, *TCBP1*, *TCBP2*, *CLEC4M* (Tv *CLEC4M-1*), *CD93* und *CFD* (siehe 4.2). Jedes der acht beschriebenen Gene kodiert für ein hypothetisches Protein mit charakteristischen Säuger-orthologen Domänen und Motiven. Die Genprodukte von *ST2L*, *IRAK3* und *MARCH3* spielen eine Rolle als negative Regulatoren innerhalb der TLR-Kaskade. Die übrigen Gene kodieren für Komponenten der Akuten Phase bzw. des Komplementsystems. Für alle Gene bis auf *TCBP1* konnten starke Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Knochenfische gezeigt werden. Auch wurden meist starke Homologien zu den entsprechenden Sequenzen im Säuger nachgewiesen. TCBP1 hingegen zeigte lediglich eine geringe Homologie (33% Sequenzübereinstimmung) zum Protein CTRP3-Like des Buntbarschs. Vor allem dies, aber auch die Identifizierung von mindestens fünf Transkriptvarianten deuten auf eine besondere, vor allem fisch-spezifische Funktion dieses Gens hin. Bisherige Studien weisen bereits auf vielfältige Funktionen hin, wie bspw. eine Beteiligung an der Akuten-Phase-Reaktion (Teles *et al.*, 2011), eine Rolle als Opsonin (Kodama *et al.*, 1999) bzw. eine Erhöhung der Phagozytose in Anwesenheit von Komplementfaktoren (Nakanishi *et al.*, 1991).

5.3 Bestätigung von *TCBP1*- und *CLEC4M*-Transkriptvarianten

Mit Hilfe des reversen *Northern Blot* konnten fünf verschiedene Transkripte des Gens *TCBP1* und zwei für das Gen *CLEC4M* nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Transkriptvarianten entstanden vermutlich durch Alternatives Spleißen (AS), ein Prozess bei dem zum einen Introns der prä-mRNA erhalten bleiben und/oder durch das teilweise Entfernen einzelner Exons neue Exonkombinationen erzeugt werden. So können unterschiedliche mRNAs eines einzelnen Gens

entstehen. Die Neu-Kombinationen von Exons durch alternatives Spleißen der Vorläufer-mRNA wurde 1978 von Gilbert *et al.* erstmals publiziert. Es wurde vermutet, dass mehrere mRNA-Varianten eines Gens entstehen können, weil das Proteom die Vielfalt des Genoms übersteigt. Inzwischen ist klar, dass zwischen 40 und 60% der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden (Modrek, 2002). AS bietet eine zusätzliche Möglichkeit, die Proteindiversität zu erhöhen, was zu einer erhöhten funktionalen Komplexität des Genoms beiträgt. So hat die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bspw., obwohl komplexer als der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, weniger Gene aber ein umfassenderes Proteom. AS ist für die Existenz physiologisch unterschiedlicher Proteine, die aus nur einem Gen resultieren, im Menschen überaus wichtig. Bekannt ist dies bspw. für das *Slo*-Gen, das für das Hörvermögen in der Kochlea verantortlich ist, das *Neurexin I*-Gen, welches eine Rolle bei der Reizübertragung an Synapsen spielt und das *Dscam*-Gen, welches an der Neuronenmigration beteiligt ist (Graveley, 2001). Viele dieser Spleißprozesse geschehen zudem gewebe- und/oder entwicklungsabhängig oder unter bestimmten physiologischen Bedingungen (Brudno *et al.*, 2001).

Aufgrund des Hinweises auf mehrere Transkriptvarianten durch den reversen *Northern Blot* wurde durch eine gezielte Amplifikation des gesamten Leserahmens von *TCBP1* in getrennten Milz-, Kiemen-, Nieren- und Leberproben nach weiteren Varianten gesucht und insgesamt fünf verschiedene Transkripte, mit verschiedener Gewebeverteilung, identifiziert. In der Milz wurden bisher die meisten Varianten identifiziert (Tv 2, 3, 4, 5), in der Niere lediglich Variante 1. Es wäre möglich, dass TCBP1 eine besonders wichtige Rolle in der Milz spielt, da es hier in vielen Varianten vorliegt. Es könnte hier an der Erkennung verschiedenster Antigene beteiligt sein. Aufgrund der fehlenden Exons 2, 3 und 4 und somit fehlenden Startcodons des *Nonsense*-Transkripts Tv 5 kommt es zu einer fehlerhaften, nicht funktionalen hypothetischen Proteinsequenz. Welche Rolle dieses spielt, ist nicht bekannt. Vermutlich werden diese Transkripte mittels dem *Nonsense-mediated mRNA decay* schnell degradiert, um Schädigungen des Organismus durch unvollständige und fehlerhafte Proteine zu vermeiden (Amrani *et al.*, 2006). Fraglich ist aber, ob und welche Funktion dieses kurze Peptid hat.

Eine exakte Größenzuordnung der bisher sequenzierten Produkte zu den detektierten Fragmenten ist aufgrund der geringen Längenunterschiede zwischen den Varianten nicht möglich. Der kleinste Längenunterschied zwischen den Trankripten beträgt lediglich 41bp, wodurch es trotz mehrstündiger elektrophoretischer Auftrennung in einem hochprozentigem Agarosegel (2.5%) nicht zu einer vollständigen und detektierbaren Auftrennung kam. Möglich ist somit auch die

Existenz weiterer Banden bzw. Transkriptvarianten. Eine quantitative Bestimmung der einzelnen *TCBP1*-Tvs erfolgte noch nicht, weshalb über die Korrelation der Signalstärke auf der Membran und der tatsächlichen Häufigkeit im Gewebe keine Aussage getroffen werden kann. Die gewebespezifische Genexpression und entsprechende potenzielle Proteinexpression könnte auf gewebespezifische Funktionen von *TCBP1* hinweisen. Die putativen Proteinstrukturen von TCBP1 unterscheiden sich hinsichtlich eines N-terminalen Signalpeptides, welches in Isoform 1 und 2 vorhanden ist, im Gegensatz zu Isoform 3 und 4. Dieses wurde zwar lediglich durch *in silico*-Analysen nachgewiesen, dennoch könnte es einen Hinweis auf eine Funktion außerhalb der Zelle geben, da es möglicherweise über den sekretorischen Weg aus der Zelle transportiert wird, was aber auch für die anderen Varianten nicht ausgeschlossen werden kann. Transmembrandomänen wurden nicht identifiziert, ein Einbau in eine Phospholipidmembran kann somit ausgeschlossen werden. Als potenzielles CRP-Analog bindet TCBP1 pathogene Oberflächen und aktiviert so möglicherweise den klassischen Komplementweg (Bayne *et al.*, 2001). Die strukturelle und funktionale Diversität von *TCBP1* durch alternatives Spleißen könnte es ermöglichen, bei veränderten Umweltbedingungen oder Stresssituationen spezifischer und effektiver zu reagieren und die Bindeeigenschaften für Pathogene zu erhöhen. Dies wurde bereits für die duplizierten Komplementgene *C3-1*, *C3-3* und *C3-4* in den Salmoniden publiziert (Sunyer *et al.*, 1997). Möglicherweise existieren auch weitere *TCBP1*-Genvarianten im Genom der Regenbogenforelle. Untersuchungen dazu werden in Zukunft folgen. Die Funktion vieler Faktoren des Immunsystems, wie bspw. bei Zytokinen, basiert auf dem Prozess des alternativen Spleißens (Lynch, 2004). Tatsächlich wird fast die Hälfte der Gene in T- und B-Zellen im Menschen auf diese Weise modifiziert (Grigoryev *et al.*, 2009). Auch für den Komplementrezeptor CD21 auf B-Zellen wurden in der Maus zwei Isoformen gefunden (Kurtz *et al.*, 1990). In den Knochenfischen wurde ebenfalls eine Reihe von Genen des Immunsystems identifiziert, die durch alternatives Spleißen prozessiert werden, wie z.B. das Gen kodierend für das Interferon IFN Typ I in der Regenbogenforelle (Purcell *et al.*, 2009). Insgesamt scheinen viele Rezeptoren von Leukozyten der Fische funktional durch AS beeinflusst zu werden (Maisey und Imarai, 2011). Zukünftig interessant ist vor allem die Expressionsuntersuchung der einzelnen Transkriptvarianten in den Organen gesunder Forellen beider Stämme. Eine unterschiedliche Expression der Varianten nach Temperatur- und Infektionsstress in den einzelnen Geweben und möglicherweise zwischen den Stämmen ist anzunehmen und könnte einen Hinweis darauf geben, welche Transkriptvarianten/Isoformen von besonderer Wichtigkeit sein könnten.

Das *CLEC4M*-Amplifikat und die Transkriptvariante *CLEC4M-1* konnten deutlich getrennt voneinander durch den reversen *Northern Blot* detektiert werden. Für das Gen *CLEC4M* liegen Messdaten beider Transkriptvarianten vor (siehe 4.4). Bereits nachgewiesen werden konnte, dass *CLEC4M-1* in den Geweben gesunder Forellen stets deutlich geringer exprimiert wurde. Die Signale der Banden in der Leber waren insgesamt etwas schwächer, qRT-PCR Daten belegen, dass im Vergleich zu den bisher gemessenen Geweben die Expression hier mit Abstand am geringsten war. Allerdings kann die Existenz weiterer Transkriptvarianten nicht ausgeschlossen werden, da nicht alle Organe im Fisch untersucht wurden. Der Unterschied zwischen den beiden CLEC4M-Isoformen besteht in der Existenz einer 19 aa langen Transmembrandomäne in CLEC4M (siehe 4.2.3), die von einem Großteil des Exon 2 kodiert wird. Genau dieses Exon fehlt in der Transkriptvariante. Diese Isoform scheint demnach ein lösliches Protein zu sein. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Mosley *et al.* (1989) für den IL4-Rezeptor (IL4R) der Maus. Dieser Rezeptor bindet die lösliche Form, das anti-inflammatorische Zytokin IL4, und bewirkt bspw. eine Verringerung von Th1-Zellen und Makrophagen im Säuger. IL4 ist während einer Infektion also wichtig für die Homöostase des Immunsystems. Durch AS generierte lösliche Zytokinrezeptoren bspw. sind in der Lage entweder ihren Rezeptor oder andere Zytokine zu binden und so zu inhibieren (Fernandez-Botran, 1991). Auch für die lösliche Form des CLEC4M-Rezeptors ist eine ähnliche Funktion denbar, möglicherweise inhibiert die Isoform 1 den CLEC4M-Rezeptor oder bindet andere Faktoren, um diese vor Abbau zu schützen.

CLEC4M zeigte mit bis zu $4x10^6$ Kopien/1 µg RNA in der Milz und $1.3x10^6$ in den Kiemen eine sehr hohe Expression und scheint in diesen Organen eine wichtige Rolle zu spielen. Lektine sind Moleküle mit vielfältiger Funktion wie dem Erkennen und Binden pathogener Oberflächen, wie bspw. Ewart *et al.* (1999) für ein Lektin im Lachs berichteten, welches die Mannose von *A. salmonicida* bindet. Anschließend kann z.B. das Komplementsystem über den Lektin-Weg ausgelöst werden. Ein Lektin der Maus, DC-SIGN, welches auf Makrophagen der marginalen Zone der Milz exprimiert wird, scheint an der direkten Erkennung von Pathogenen im Blutstrom beteiligt zu sein (Geijtenbeek *et al.*, 2002). Die Transkriptvariante und die quantitativen Unterschiede von CLEC4M/-1 in den Geweben weisen auf eine Erhöhung der Funktionalität von *CLEC4M* hin.

5.4 Biologisch signifikante Komplementexpression in Milz und Kiemen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Regenbogenforellen-spezifische Gene, die Komponenten der Komplementkaskade, potenzielle Initiatoren, Regulatoren und Rezeptoren kodieren, in der Milz und den Kiemen sowie der Leber gesunder Forellen quantifiziert. Für einen Großteil der Komplementkomponenten, wie z.B. C3, gilt die Leber als Hauptsyntheseort (Alper *et al.*, 1969). Morgan und Gasque (1997) sowie Andrews *et al.* (1995) allerdings fassten in ihren Übersichtsartikeln zahlreiche Publikationen über extrahepatische Expressionsorte wie Endothel- und Epithelzellen der Niere, Lunge und Darm, Fibroblasten, Hirnzellen, sowie Monozyten und Makrophagen als wichtige extrahepatische Syntheseorte von Komplementfaktoren im Säuger zusammen. C1q bspw. wird sogar nur sehr gering in der Leber synthetisiert. Auch über eine Verbindung des Komplementsystems zum Lipidmetabolismus wurde publiziert (White *et al.*, 1992a). Vor allem aber für die Knochenfische scheint die extrahepatische Expression von Komplementfaktoren von großer Bedeutung zu sein, weil diese in ständigem Kontakt zu aquatischen Pathogenen stehen und lokale Abwehrmechanismen an den Eintrittsorten wie Kiemen und Darm besonders wichtig sind. Lovoll und Mitarbeiter fanden bereits eine extrahepatische Genexpression für die *C3*- und *C7*-Subtypen sowie für *C4*, *C5* und *CFB* in Milz, Kiemen, Niere, Darm, Haut, Muskel, Herz und Gonaden (Lovoll *et al.*, 2007). Zwar wurde deren Expression im Vergleich zur Leber als teilweise sehr gering, aber dennoch biologisch signifikant beschrieben. In dieser Arbeit gelang erstmals eine umfassende, vergleichende Expressionsstudie der Komplementgene und Genen der Akuten Phase (Initiatoren des Komplements) für die Milz, Kiemen und Leber in einem Vertreter der Knochenfische. Zudem erfolgte die Quantifizierung der Gene vergleichend in zwei Regenbogenforellenstämmen mit unterschiedlicher Robustheit gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren. Mit Hilfe der während dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien konnte eine Expression fast aller gemessenen Gene in der Milz und den Kiemen nachgewiesen werden. Das Expressionsmuster der gemessenen Gene unterschied sich je nach Expressionsort, vor allem die Expressionsmuster der Milz und Kiemen waren von dem der Leber sehr verschieden. Es schien kein Weg des Komplementsystems besonders über- oder unterrepräsentiert zu sein.

In der Milz am stärksten exprimiert waren die Gene *C7-2*, *CD59-1*, *C6*, *C1q* und *MBL2* mit 9.6 bis 800 Mio. Kopien/1µg RNA. Die Top3-Expressoren der Milz zeigten jeweils höhere absolute Kopienzahlen als das am stärksten exprimierte Gen in der Leber, allerdings müssen hierbei die

EEF1A1-normierten Werte beachtet werden, welche in der Leber deutlich höher waren als in den anderen Geweben. Die Gene *CLEC4M*, *CLEC4M-1*, *C1q*, *MBL2*, *CFD* und *C7-2* waren dennoch in der Milz höher exprimiert als in der Leber (Tabelle 22). Auch Lovoll *et al.* (2007) fanden eine außerordentlich hohe Expression von *C7-2* in der Milz der Regenbogenforelle im Vergleich zur Leber (bis zu 250-fach). Somit scheint die Leber nicht der Hauptsyntheseort dieser Gene in der Regenbogenforelle zu sein. *MBL2* und *C1q* spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung pathogener Strukturen und der Initiierung des Lektin- bzw. klassischen Weges. Dies ist in der Milz von großer Bedeutung, da hier Pathogene direkt aus dem Blutstrom gefiltert und bekämpft werden (Press und Evensen, 1999). In geringerem Ausmaß höher exprimiert in der Milz im Vergleich zur Leber sind die Gene *CLEC4M* und die Transkriptvariante *CLEC4M-1*, kodierend für Lektine, die Kalzium-abhängig an Mannose binden können, die bspw. in pathogenen Oberflächen von *A. salmonicida* enthalten sind. So könnte eine frühe und schnelle Bekämpfung körperfremder Stoffe ermöglicht werden. *C6*, *CD59-1* und *C7-2* hingegen sind an der Bildung bzw. Regulation des Porenkomplexes über den terminalen Weg beteiligt. Dennoch ist der Großteil der Gene deutlich geringer exprimiert in der Milz im Vergleich zur Leber wie die Werte der Tabelle 22 deutlich zeigen.

Tabelle 22 Überblick über die Expressionsunterschiede der Genexpression ausgewählter Gene in der Milz und den Kiemen im Vergleich zur Leber.

Genname	FC Milz/Leber		FC Kiemen/Leber	
	TCO	BORN	TCO	BORN
TCBP1	-119109.18	-1593.25	-1090.94	-2220.97
TCBP2	-135.11	-68.09	-368.21	-76.33
CLEC4M-1	**2.86**	-1.22	-1.05	-4.61
CLEC4M	**1.29**	-3.25	-1.78	-8.10
C1q	**28.46**	**23.97**	**4.29**	-2.99
C4	-26.52	-57.97	-150.00	-366.79
C3-1	-551.41	-394.07	-1775.06	-1107.68
C3-3	-690.85	-837.68	-1222.68	-938.56
C3-4	-320.50	-466.60	-1407.01	-439.25
MBL2	**17.38**	**6.49**	-6.96	-12.82
CFB1	-26720.92	-14757.38	-1449.08	-1649.75
CFB2	-1085.85	-603.32	-535.29	-195.12
CFD	**5.09**	**4.56**	**40.12**	**23.01**
C7-1	-4.73	-4.73	-3.64	-5.57
C7-2	**18.27**	**10.05**	-9.08	-16.05
CD59-1	-1.29	1.09	-22.98	-9.98
CD59-2	-1.10	-62.27	-1.31	-8.16
SERPIN1	-1574.98	-1016.56	-15276.97	-3970.68

Allerdings muss erwähnt werden, dass in der Leber nicht alle Gene, wie in Milz und Kiemen, gemessen werden konnten, so dass möglicherweise die tatsächlich am stärksten exprimierte Gene nicht identifiziert wurden.

In den Kiemen wurden die meisten Transkripte für die Gene *CFD*, *C1r/C1s*, *MBL2*, *CLEC14A* und *C1q* und identifiziert mit 3.5 bis 6.2 Mio. Kopien/1µg RNA. Auffällig ist, dass diese Gene an sehr frühen Funktionseinheiten des Komplementsystems, wie der Erkennung von Pathogenen, beteiligt sind. CFD als Serinprotease ist ebenfalls an der frühen Einleitung inflammatorischer Prozesse, über den alternativen Weg, beteiligt. In den Kiemen waren die Kopienzahlen der Gene insgesamt zwar geringer als in der Milz, allerdings trotzdem von biologischer Signifikanz. Beachtet man aber, dass die Kiemen kein typisches Immunorgan darstellen, sondern eine Ansammlung von T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, Makrophagen und Granulozyten in den Kiemenlamellen, zusammengefasst von Salinas *et al.* (2011), und ein von Koppang *et al.* (2010) beschriebenes interbranchiales lymphatisches Gewebe ihre Immunkompetenz ausmachen, dann ist die Genexpression der Komplementgene als enorm anzusehen. Da die Kiemen eine der Eintrittspforten für Pathogene darstellen (Holzer *et al.*, 2003), ist eine lokale Bekämpfung eingedrungener Erreger und eine Aktivierung einer Immunabwehr zur Vermeidung einer Infektion sehr wichtig für den Organismus. Auch im Falle von systemischen Erregern, wie *A. salmonicida*, die über den Blutstrom in die Kiemen transportiert werden, sind immunologische Abwehrreaktionen nötig. *C1r/C1s*, *CFB1*, *CFB2* und *C5aR* sind in den Kiemen beider Forellenstämme TCO und BORN stärker exprimiert als in der Milz, *C1q* und *CFD* sogar stärker als in der Leber. *C1r/C1s*, *C1q*, *CFD*, *CFB1* und *CFB2* kodieren für Komponenten die am Anfang der Komplementkaskade agieren, um diese in Gang zu setzten. C5aR ist ein Rezeptor auf B-Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen, der Spaltprodukte der Komplementkaskade erkennt und dann Phagozytose und Chemotaxis weiterer Immunzellen vermittelt. Diese Gene scheinen also besonders für die lokale Immunabwehr der Kiemen von Bedeutung zu sein. Auch für diese Gene scheint also die Leber nicht der Hauptsyntheseort zu sein. Interessanterweise wurde auch im Menschen eine extrahepatische Expression für die Gene *C1q*, *MBL2*, *MASP1*, *MASP1-3*, *CFD* und *C7* beschrieben (Lovoll *et al.*, 2007; Seyfarth *et al.*, 2006; Tenner und Volkin, 1986; White *et al.*, 1992b; Wurzner *et al.*, 1994).

Eine im Vergleich zu Milz und Kiemen besonders starke Expression der gemessenen Gene in der Leber zeigten erwartungsgemäß die Akute-Phase-Gene *TCBP1* und *TCBP2*, Gene des

klassischen Wegs *C4*, *C3-1*, *C3-3*, *C3-4*, aber auch Gene des alternativen Wegs *CFB1*, *CFB2* sowie das Gen, das für den C1-Inhibitor *SERPIN1* kodiert.

Die fünf in der Milz am geringsten exprimierten Gene waren *MASP3*, *C7-1*, *C5*, *C1QLAS* und *CFP2*, wobei *CFP2* mit immerhin ca. 47000 Kopien/1µg RNA trotzdem verhältnismäßig hoch exprimiert war.

Für die Gene *TCBP1*, *MASP2*, *CFI*, *C1QLAS* und *C5* wurden in den Kiemen die wenigsten Transkripte detektiert. *CFP2* hingegen konnte gar nicht detektiert werden. Für *C5* wurden nur ca. 700 Transkripte/1µg RNA bestimmt, was deutlich geringer ist als die Transkriptzahl des in der Milz am geringsten exprimierten Gens.

Die in der Leber niedrigsten Transkriptzahlen wurden für *CLEC4M-1*, *CFD* und *C7-1* ermittelt, wobei *C7-1* auf ca. 600 Kopien/1µg RNA kam. *C1QL4*, ein Gen kodierend für einen potenziellen Initiator, konnte in der Leber nicht detektiert werden.

Die Leber in der Regenbogenforelle scheint also, wie auch im Säuger, das wichtigste Syntheseorgan für Akute-Phase-Gene wie die *C3*-Subtypen, *C4*, *MBL2*, *TCBP1* und *TCBP2* zu sein. Ebenso Gene kodierend für Komponenten des alternativen Wegs *CFB1* und *CFB2* waren deutlich höher exprimiert in der Leber. Das Komplementsystem unterliegt, zum Schutz vor Angriff und Zerstörung körpereigener Zellen einer starken Regulation (Gasque, 2004; Jozsi *et al.*, 2007). Das Gen, das für den C1-Inhibitor *SERPIN1* kodiert, war von den gemessenen Genen das am stärksten exprimierte in der Leber, was auch in der Regenbogenforelle auf eine Funktion als Akute-Phase-Protein hinweisen könnte (Davis *et al.*, 2010). Eine mäßige Expression lag in Milz und Kiemen vor. Auch *CFI* und *CFH* (Daten nicht gezeigt), die für die Inhibitoren von C3b kodieren und *CD59-1*, welches für den Inhibitor des terminalen Weges kodiert, wurden in der Leber hoch exprimiert. *CD59-1* zeigte auch sehr hohe Transkriptzahlen in Milz und Kiemen. *CFI* und *CFH* hingegen waren generell sehr gering exprimiert in Milz und Kiemen. Diese Gene scheinen also gleichzeitig mit Genen die für die Aktivierung des Komplementsystems notwendig sind, vor allem in der Leber hoch exprimiert zu sein.

5.5 Linienspezifische Komplementexpression in den Kiemen nach einer *A. salmonicida*-Stimulation

Die Kiemen der Fische sind kein typisches Immunorgan, aber dennoch in der Lage durch GIALT und ILT eine Immunantwort in Gang zu setzen. Diese sind aber bisher nur wenig untersucht, weshalb innerhalb dieser Arbeit geprüft wurde, welche Rolle die Kiemen nach einer *A.*

salmonicida-Infektion spielen und welche Unterschiede zwischen den beiden Forellenstämmen TCO und BORN bestehen. Da die mukösen Gewebe des Fischs, und dabei vor allem die Kiemen, aber bspw. hinsichtlich der Entwicklung neuer Vakzinierungsstrategien wichtig sind, besteht großes Interesse, die Immunkompetenz sowie Immunmechanismen dieser Gewebe aufzuklären. Auch aus evolutionsbiologischer Sicht ist die Erforschung branchialer Immunmechanismen interessant, da angenommen wird, dass der Thymus der Fische aus Kiemengewebe hervorging (Matsunaga, 2001).

Viele Fische sind sogenannte Überträgerfische für das Pathogen *A. salmonicida*. Die Krankheit Furunkulose bricht aber meist erst bei Stress aus. Moribunde und tote Fische scheiden das Pathogen in hohen Mengen ins Wasser aus und infizieren weitere Fische. Bruno (1986) aber zog auch eine *A. salmonicida*-Besiedelung des Kiemenepithels oder sekundärer Kiemenlamellen in Betracht. Mehrere Arbeitsgruppen postulierten vor allem den gastro-intestinal-Trakt als natürliche Infektionsroute von *Aeromonas* (Lodemel *et al.*, 2001; Ringo *et al.*, 2004; Mulder *et al.*, 2007). *A. salmonicida* ist ein systemischer Erreger, der sich mglw. von dort über Blut und Lymphe im gesamten Organismus ausbreiten kann und so eine Immunantwort in entsprechenden Organen auslösen kann (Burr *et al.*, 2005). Auch Laing *et al.* (1999) konnten dies bereits für die Expression von *iNOS* in den Kiemen von Regenbogenforellen zwei Tage nach einer *A. salmonicida*-Infektion (2×10^8 Zellen/Fisch) zeigen. Interessanterweise konnten Campos-Perez *et al.* (2000) eine schnellere *iNOS*-Expression in den Kiemen nach intraperitonealer Infektion als nach einer Bad-Vakzinierung mit Renibacterium salmoninarum zeigen. Außerdem wurde eine iNOS-Expression durch Blutleukozyten ausgeschlossen, was auf eine tatsächliche Immunantwort und Immunkompetenz spezialisierter Bereiche der Kiemen, wie dem GIALT und ILT, hindeutet. Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen bezüglich der Kiemen (siehe 5.4) und auch von anderen durchgeführte Studien konnten bereits wichtige Immunparameter in den Kiemen, wie bspw. Akute-Phase-Proteine (Chen *et al.*, 2008) sowie IL-1β und TNF-α (Zou *et al.*, 1999) nachweisen.

Für den vorliegenden Versuch erfolgte die Infektion der Tiere mit dem Pathogen intraperitoneal, die Probenahme erfolgte nach 6 und 12 Stunden sowie nach 1, 2, 3 und 7 Tagen (Messung ausgewählter Gene nach 14 Tagen). Innerhalb unserer Analysen konnten wir zunächst feststellen, dass viele Gene zu Beginn der Infektion und teilweise auch zu den weiteren gemessenen Zeitpunkten in ihrer Expression vermindert waren. Dies betraf die Gene *CD93*, *CLEC4M-1*, *C3*-

1, *C4*, *CFB1*, *MASP2* in TCO**,** *C1QLAS*, *C5aR*, *C7-2* in BORN sowie *TCBP1*, *TCBP2*, *C7-1*, *CD59-1* in beiden Stämmen.

Vor allem Gene, welche für potenzielle Initiatoren des Komplementsystems kodieren, *TCBP1*, *TCBP2*, *C1QLAS*, und *CD93*, wurden zu Beginn der Infektion in ihrer Expression vermindert. Die Gene *CD93*, *TCBP1*, *C1QLAS*, *CFB1*, *C5aR* und *C7-2* stiegen auch im weiteren Infektionsverlauf nicht über die Grundexpression hinaus an, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese Gene in den Kiemen während einer Infektion mit *A. salmonicida*, zumindest zu den gemessenen Zeitpunkten, keine Rolle an der Erkennung von Antigenen dieses Pathogens zu spielen scheinen. Allgemein festzustellen ist, dass im Stamm BORN ab einem Tag nach der Infektion deutlich mehr Gene hochreguliert wurden. Die Abbildung 48 zeigt einen Gesamtüberblick über die Anzahl der signifikant regulierten Gene zu den einzelnen Zeitpunkten vergleichend in beiden Forellenstämmen. Die entsprechenden Gene sind im Anhang F zu finden.

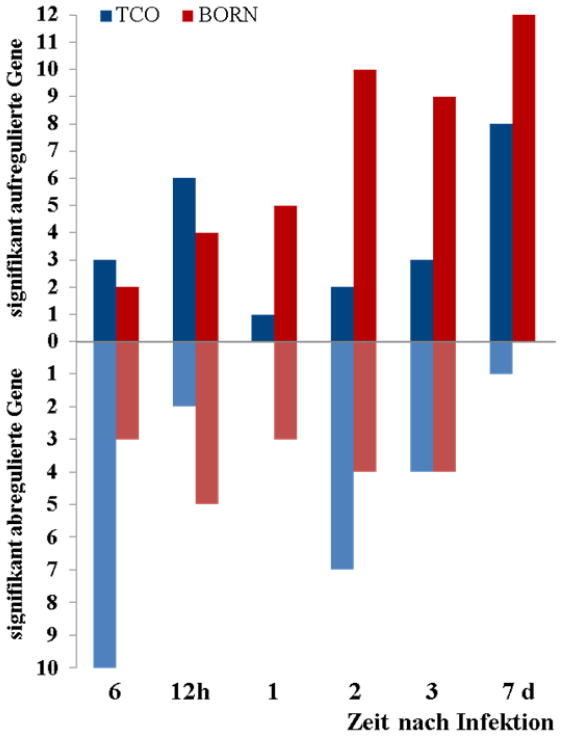

Abbildung 48 Anzahl signifikant regulierter Gene zu den gemessenen Zeitpunkten während einer *A. salmonicida*-Infektion in den Kiemen der Regenbogenforellenstämme TCO und BORN.

Das Gen *C1r/C1s*, welches für eine der C1q-assoziierten Serinproteasen im klassischen Weg kodiert, wurde nach 12 und 24 Stunden sowie nach zwei und drei Tagen im Stamm BORN marginal signifikant aufreguliert, was auf eine gesteigerte Spaltung der nachfolgenden

Komponenten C4 und C2 hinweisen könnte. Zudem bestand nach sechs Stunden, zwei und sieben Tagen eine marginal signifikant höhere Expression des Gens im Stamm BORN, im Stamm TCO erfolgte zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine signifikante Regulation. Ebenso wurden die Gene *C2-B* nach zwei und sieben Tagen und *C4* nach zwei und drei Tagen hochreguliert in den BORN-Forellen, allerdings erreichte die erhöhte Expression nicht das durchschnittliche Expressionsniveau der Gene im Stamm TCO. *C2-B* zeigt in den Knochenfischen vergleichbare Sequenzähnlichkeiten zum *C2*-und *CFB*-Gen der Säuger und noch unklar ist, ob diese Protease wirklich (nur) im klassischen Weg aktiv ist (Sunyer *et al.*, 1998).

Die Expression der Gene *MBL1* und *MBL2*, deren Genprodukte an der Erkennung von Zuckermolekülen pathogener Oberflächen beteiligt sind, waren bereits zu Beginn der Infektion stark erhöht im Stamm BORN. Dort lag eine signifikant erhöhte Expression von *MBL1* nach einem, zwei und sieben Tagen vor. Im Stamm TCO war die Transkriptionserhöhung nicht signifikant. *MBL2* hingegen war auch im Stamm TCO bereits nach 12 Stunden sowie nach einem, zwei und drei Tagen leicht erhöht, in BORN ebenfalls nach zwei und dann besonders nach drei Tagen, wobei hier auch eine marginal signifikant höhere Expression gegenüber der in den TCO-Forellen vorlag. Eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Antigenen mittels *MBL1* und *MBL2* in den Kiemen (von BORN-Forellen) scheint denkbar. Es wird angenommen, dass die MBL-assoziierte Serinprotease MASP2 an der Spaltung von C4 und nachfolgend an C2 beteiligt ist (Hajela *et al.*, 2002). Das Gen *MASP2* wurde allerdings erst nach sieben Tagen stärker exprimiert im Stamm TCO, nicht in BORN. MASP3 hingegen soll MASP2 hemmen (Sunyer *et al.*, 2003). *MASP3* wurde in BORN nach drei Tagen stärker (und nicht mehr nach sieben Tagen) exprimiert, in TCO erst nach sieben Tagen, wodurch in BORN mglw. eine schnellere Funktion von MASP2 möglich war durch die fehlende Hemmung durch MASP3. Das Gen kodierend für MASP1 wurde in der Regenbogenforelle noch nicht identifiziert. Möglicherweise spielt aber genau diese Protease eine wichtige Rolle bei der Bildung der C3-Konvertase über den Lektin-Weg.

Ein beachtlicher Unterschied zwischen den beiden Stämmen bestand in der Expression des Gens *C3-1*, welches für eine der drei Schlüsselkomponenten des Komplementsystems kodiert. *C3-1* wurde in den TCO-Forellen nach drei Tagen marginal signifikant erhöht, in den BORN-Forellen jedoch bereits nach zwei Tagen und besonders nach drei Tagen. *C3-1* scheint also in den Kiemen beider Stämme mglw. eine wichtige Rolle bei der Opsonisierung von *A. salmonicida* und der

Bildung der C3-Konvertasen zu spielen. Die Gene *C3-3* und *C3-4* hingegen zeigten in keinem der beiden Stämme eine signifikante Expressionserhöhung, dafür aber eine deutliche höhere Grundexpressionen als *C3-1*, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese beiden Gene mglw. trotzdem an einer Immunreaktion beteiligt sein könnten.

Gene des alternativen Wegs zeigten insgesamt kaum Expressionsunterschiede im Verlauf der Infektion. Das Gen kodierend für die Serinprotease CFB ist ebenfalls dupliziert in der Regenbogenforelle, benannt als *CFB1* und *CFB2*. Beide Gene zeigen Sequenzähnlichkeiten zu *C2* und *CFB* im Säuger. Sunyer *et al.* (1998) charakterisierten beide Gene und konnten eine Rolle von *CFB2* im alternativen und zusätzlich im klassischen Weg zeigen. Ob *CFB1* ebenfalls in beiden Wegen agiert ist aber noch unklar. Nur *CFB1* wurde im Stamm TCO nach 12 Stunden leicht erhöht exprimiert. *CFD* zeigte in beiden Stämmen erst nach sieben Tagen eine leichte Transkriptionserhöhung. *CFP2*, kodierend für einen der drei potenziellen C3-Konvertase-Stabilisatoren Properdin, war kaum exprimiert in den Kiemen, was die Frage aufwirft, ob überhaupt eine Reaktion über den alternativen Weg in den Kiemen stattfindet oder hier mglw. noch nicht identifizierte Isoformen aktiv geworden sind. Allerdings konnten Zhou *et al.* (2012) in ihrer Studie im Wels eine Aufregulation von Genen des alternativen Komplementwegs (*CFB*, *CFD*) in den Kiemen nach bakterieller Infektion zeigen.

Die Gene des terminalen Wegs wurden unterschiedlich zwischen beiden Linien reguliert. Während *C5* nach sieben und *C7-1* nach drei Tagen nur im Stamm BORN in ihrer Expression signifikant erhöht waren, wurden *C7-2* und *C9* gar nicht erhöht. *C7-2* wurde im Stamm TCO im Verlauf der Infektion nicht unterschiedlich reguliert, im Stamm BORN hingegen herabreguliert, was auf eine von *C7-1* abweichende Funktion in den Kiemen bzw. nicht vorhandene Relevanz während der Infektion hinweisen könnte. Die beachtliche Aufregulation von *C7-1* im Stamm BORN nach drei Tagen könnte auf eine besondere Rolle dieses Gens im Stamm BORN hinweisen. Gerwick *et al.* (2007) hingegen fanden eine erhöhte Expression des duplizierten Gens *C7-2* in der Leber von Regenbogenforellen 24 Stunden nach einer Infektion mit *Listonella (Vibrio) anguillarum*, was eine gewebespezifische Funktion von *C7-1* und *C7-2* während einer Infektion in der Regenbogenforelle vermuten lässt. *C6* wurde in beiden Stämmen nach drei Tagen aufreguliert, *C8* nur im Stamm TCO nach bereits 12 Stunden. Offensichtlich ist es zur Aktivierung des terminalen Wegs gekommen, allerdings ist fraglich, ob auch eine verstärkte Porenbildung stattgefunden hat, da das Gen *C9*, kodierend für die finale Komponente der Pore,

auch sieben Tage nach Infektionsstart in seiner Expression noch nicht erhöht wurde. Allerdings lag dieses Gen mit ca. 2.6-5.3 x 10^5 Kopien/1 µg RNA in seiner Grundexpression hoch exprimiert vor, weshalb eine Erhöhung der Expression möglicherweise nicht nötig war.

Das Komplementsystem schien vor allem im Stamm BORN im Laufe der Infektion einer starken Regulation zu unterliegen. Die Gene *SERPIN1* (C1-Inhibitor), *CFI* und *CFH* (kodiert für Co-Faktor von CFI), welche C3 inaktivieren, wurden in diesem Stamm teilweise bereits nach 12 Stunden bis hin zu sieben Tagen signifikant hochreguliert, wohingegen im Stamm TCO zu diesen Zeitpunkten keine signifikanten Differenzen ermittelt wurden. CFH und CFI sind gemeinsam für die Inaktivierung von C3 zuständig, wobei die entstandenen Komponenten iC3b und C3d für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems sorgen, in dem diese an CR2 und CR4 auf B- und T-Lymphozyten binden. Möglicherweise kann also der Stamm BORN die Aktivität des Komplementsystems besser kontrollieren und so Energie sparen, weil durch die Inaktivierung von C3b ein Fortführen der Komplementkaskade nicht mehr möglich bzw. nötig ist. Ebenso kann in der Folge auch das adaptive Immunsystem mglw. früher aktiviert werden. Der negative Regulator des terminalen Wegs CD59 wird ebenfalls von duplizierten Genen kodiert. Die Expression von *CD59-1* wurde im Stamm BORN nach sieben Tagen, *CD59-2* in beiden Stämmen nach sieben Tagen leicht erhöht, *CD59-2* zeigte auch nach sechs und zwölf Stunden eine leichte Aufregulation in TCO. Demnach könnte es in der späten Phase der Infektion in beiden Stämmen zu einer Inaktivierung des Membran-Angriffs-Komplex gekommen sein.

Das für einen Anaphylatoxin-Rezeptor kodierende Gen *C3aR* zeigte zu allen gemessenen Zeitpunkten eine leichte, marginal signifikante Expressionserhöhung im Stamm BORN, aber auch eine (sehr geringe) Aufregulation nach zwei und sieben Tagen in TCO. Erstaunlich ist die sehr frühe Aufregulation im Stamm BORN, da dieser Rezeptor hauptsächlich auf B-Lymphozyten exprimiert wird und somit eine Rolle im adaptiven Immunsystem spielt. Auch dieser Umstand könnte auf eine frühere Aktivierung adaptiver Immunmechanismen im Stamm BORN hinweisen.

Vor allem durch den ständigen Kontakt mit kommensalen, also harmlosen und nützlichen Keimen, müssen die Kiemen aber auch in der Lage sein, immunsuppressiv zu reagieren. Eine vollständige Auslösung der Immunantwort als Reaktion auf jedes Pathogen würde den Organismus viel Energie kosten. So könnten die ausgeprägten Regulationsmechanismen des Komplementsystems der BORN-Forellen ein Hinweis auf ein energiesparendes Immunsystem

sein. Takizawa *et al.* (2011) bspw. fanden eine erhebliche Expression des Lymphozyten-Aktivierungs-Gen 3 (*LAG-3*) und Trepicchio (1998) eine hohe Expression des Gens *IL-11* in den Kiemen von Regenbogenforellen, beides Gene, die mit anti-inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Solche Gene sind vor allem in den zur Umwelt exponierten Geweben wichtig, um vorschnelle Reaktionen des Immunsystems zu verhindern.

Die Daten zeigen insgesamt die Immunkompetenz der Kiemen im Verlauf einer Infektion mit *A. salmonicida*, da vor allem in den BORN-Forellen eine zeitlich veränderte, signifikante Regulation vieler Komplementgene verzeichnet wurde. Zudem scheinen die Kiemen in der Lage (auch) nach Eintritt von Pathogenen in den Blutkreislauf, durch eine intraperitoneale Infektion, Abwehrmechanismen zu mobilisieren. Sie scheinen somit auch an der systemischen Immunantwort beteiligt zu sein und nicht nur auf lokale Infektionen zu reagieren. Außerdem wurde gezeigt, dass die BORN-Forellen das Komplementsystem nach einer *A. salmonicida*-Infektion verstärkt über den klassischen und Lektin-Weg Gene aktivieren zu können, wohingegen im Stamm TCO teilweise höhere Expressionsniveaus vorlagen, aber keine veränderte Aktivität der Genexpression zu verzeichnen war. Außerdem wurden auch Gene, die für Regulatoren kodieren, stärker aktiviert im Stamm BORN, wodurch diese mglw. Energie sparen und auch eine schnellere Aktivierung der adaptiven Immunantwort einleiten können.

5.6 Aufregulation von Komplementgenen in Kiemen-Fibroblasten (Zelllinie RTgill-W1) nach Stimulation mit *A. salmonicida*

Die bisher immunologisch kaum untersuchte Zelllinie RTgill-W1, bestehend aus Kiemen-Fibroblasten, sollte hinsichtlich ihrer Immunkompetenz und Eignung für Stressexperimente untersucht werden. Bereits bekannt war, dass die Zelllinie zur Untersuchung toxikologischer Einflüsse, der Kiemenfunktion im Allgemeinen sowie die Kiemen betreffende Krankheiten geeignet ist. Die Zelllinie konnte bereits als Wirt für bestimmte Viren und die Paramoebe *Neoparamoeba pemaquidensis*, verantwortlich für die *Amoebic Gill Disease*, genutzt werden (Lee, 2009). Kürzlich wurde innerhalb einer Studie von de Bruijn (2012) nachgewiesen, dass zahlreiche Zytokine, Immunrezeptoren und andere Gene des angeborenen Immunsystems in der Zelllinie exprimiert werden und deren Expression durch eine Infektion mit dem Eipilz *Saprolegnia parasitica* ($1.7x10^4$) zu verschiedenen postinfektiösen Zeitpunkten teilweise stark erhöht war. Die höchste Expression nahezu aller untersuchten Gene wurde nach 24h festgestellt, wobei ein erster Anstieg meist nach ca. 16h zu verzeichnen war. Trotz der etwas höher

eingesetzten Pathogenkonzentration kann davon ausgegangen werden, dass der in dieser Arbeit gewählte Zeitpunkt ‚24h nach der Stimulation' zur Expressionsmessung im Zellmodell durchaus repräsentativ war. Innerhalb dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Grundexpression der meisten Komplementgene in der Zelllinie vorliegt. Für die Gene C*1QL4*, *CLEC4M*-1, *CFB2*, *C7-2*, *CFP2* und *CFI* hingegen konnten keine Transkripte detektiert werden (siehe 4.4.3). Für sieben der elf nach Stimulation untersuchten Immungene konnte eine teilweise sehr starke Expressionserhöhung nach 24h festgestellt werden. Die Expression der Gene *C7-1*, *C9*, *C5aR*, *CD59-1* war nicht erhöht oder sogar in ihrer Expression vermindert, weil entweder eine Erhöhung der Expression schon früher stattfand oder entsprechende Regulationsmechanismen zu späteren Zeitpunkten eintraten. Vor allem die Gene *C7-1* und *C9* spielen eine Rolle im späteren Verlauf des Komplementsystems im Gegensatz zu den stark erhöhten Genen *TCBP1*, *CLEC4M-1*, *C1q*, *C3-3*, *C4*, *MASP2* und *CFD*, die bereits an der Erkennung pathogener Strukturen oder frühen Bekämpfung dieser beteiligt sind. Alle hier untersuchten Gene wurden auch in Kiemengewebe infizierter Forellen untersucht (siehe 4.5). Ein zeitlicher Vergleich des Expressionsverlaufs mit der *in vivo*-Infektion der Kiemen ist jedoch nicht möglich, da hier die Pathogene von Beginn an in direktem Kontakt zu den Zellen standen, während die Keime nach intraperitonealer Injektion in den Fisch erst später über den Blutkreislauf zu den Kiemen gelangten. Erst dann konnten erste Immunreaktionen in Gang gesetzt werden. Alle Gene mit erhöhter Expression im Zellmodell zeigten auch in den Kiemen eine erhöhte Expression (zu unterschiedlichen Zeitpunkten), welche allerdings nicht immer signifikant war. Ob die Expression der Gene *C7-1*, *C9*, *C5aR*, *CD59-1* im Zellmodell zu anderen Zeitpunkten erhöht wird, muss zukünftig validiert werden. Ebenso soll eine dosisabhängige Expression aller Gene zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Da ein starker Zusammenhang zwischen der Umgebungstemperatur und der Reaktivität des Immunsystems besteht, bietet die Kombination aus verändertem Temperatur- und Pathogeneinfluss auf die Zellen eine hervorragende Möglichkeit, eine temperaturabhängige Expression der Gene zu erfassen, welche Grundlage für spätere *in vivo*-Experimente sein könnte.

Abschließend ist zu sagen, dass erstmalig der Expressionsnachweis von Genen des Komplementsystems in der Zelllinie RTgill-W1 gelungen ist sowie der Nachweis entsprechender Regulationsmechanismen nach einem *A. salmonicida*-Stimulus.

5.7 Erhöhte Diversität des Forellen-Komplements durch duplizierte Gene

Die Duplikation von Genen und ganzen Genomen ist die Grundlage der Artenentwicklung und Artenvielfalt innerhalb der *Metazoa* (Ohno, 1970). Genomsequenzierungsprojekte zeigten, dass sowohl Gen- als auch Genomduplikationen dazu beigetragen haben, Genfamilien zu erweitern. Dies betrifft einzellige Mikroorganismen wie *Mycoplasma pneumonia* (Jordan *et al.*, 2001), mehrzellige Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Wolfe und Shields, 1997), Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) (Lynch und Conery, 2000; Vision *et al.*, 2000; Wolfe und Shields, 1997) und *Oryza sativa japonica* (Reispflanze) (Goff, 2005) und letztendlich auch den Menschen, dessen Genomdiversität möglicherweise u.a. auf zwei kompletten Genomduplikationen in der frühen Evolution der Vertebraten beruht (Friedman und Hughes, 2001; Lynch, 2001; Spring, 1997; Wang und Gu, 2000; Wolfe, 2001). Eine dritte, fischspezifische Genomduplikation (3R) fand laut Taylor *et al.* (2001) vor mehr als 300 Mio. Jahren statt und bewirkte die Bildung verschiedenster neuer Genfamilien (Novak, 2006). Eine vierte Genomduplikation (4R) im gemeinsamen Vorläufer der Salmoniden fand vor 25-100 Mio. Jahren statt (Allendorf und Thorgaard, 1984). Obwohl die meisten Genome wieder zum stabilen diploiden Zustand revertierten, blieben duplizierte Gene zurück. So wurden in den Salmoniden bspw. 14 Hoxcluster identifiziert, die möglicherweise das Ergebnis dieser vierfachen Genomduplikation sein könnten (mit zwei Verlusten) (Koop, 2008). Delalande und Rescan bspw. publizierten 1999 eine gewebe- und entwicklungsabhängige Expression der duplizierten Gene *TMyoD* und *TMyoD2* in der Regenbogenforelle.

Die durch Genomduplikationen noch als dupliziert vorliegenden Gene haben für das Immunsystem der Fische eine besondere Bedeutung, weil aufgrund dessen vor allem das unspezifische Immunsystem eine dem Säuger gegenüber sehr hohe Diversität erreicht hat (Sunyer und Lambris, 1998). Diese ist nötig, da Fische im Wasser ständig verschiedensten Pathogenen ausgesetzt sind und zudem das adaptive Immunsystem dem der Säuger gegenüber unterentwickelt ist. Vergleichende Expressionsstudie von duplizierten Genen in der Regenbogenforelle existieren bisher für *C7-1*/*C7-2* und *CD59-1*/*CD59-2* (Papanastasiou und Zarkadis, 2005; Papanastasiou *et al.*, 2007). Allerdings wurden nur generelle Expressionsorte der Gene in gesunden Tieren untersucht. Expressionsanalysen duplizierter Gene nach Einwirkung verschiedener Parameter wie Infektion oder Temperaturveränderung fehlen für die Knochenfische gänzlich.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Charakterisierung duplizierter Komplementgene in der Regenbogenforelle geleistet. Verglichen wurde zunächst jeweils das Basisniveau der Gene *C3-1*/*C3-3*/*C3-4* (klassischer Weg), *CFB1*/*CFB2* (alternativer Weg), *C7-1*/*C7-2* (terminaler Weg) und *CD59-1*/*CD59-2* (Regulatoren) in der Milz, den Kiemen und der Leber gesunder Forellen der Stämme TCO und BORN (Abbildung 49). Aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeiten der Gene *CFP1*/*2*/*3* konnten lediglich *CFP2*-spezifische Primer abgeleitet werden und somit erfolgte kein sequenzspezifischer Expressionsvergleich der drei Varianten. Da *CFP2* in der Milz nur gering und den Kiemen gar nicht exprimiert wird, wurde eine Expression nach Pathogeneinfluss nicht untersucht.

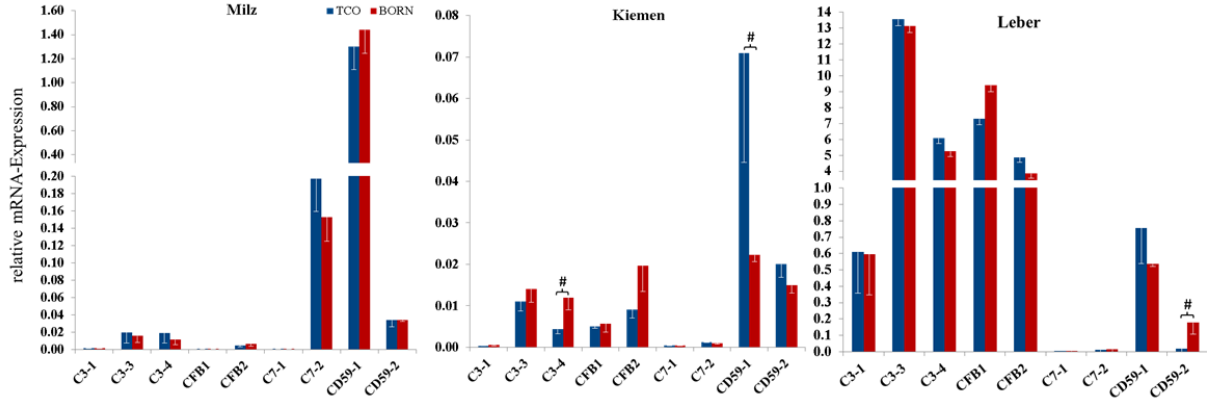

Abbildung 49 Relative Expression duplizierter Komplementgene in Milz, Kiemen und Leber gesunder Regenbogenforellenstämme TCO und BORN.

Die Genexpression der analysierten Gene unterscheidet sich teilweise sehr stark in ihrer Grundexpression in den Geweben gesunder Tiere.

Die Gene *C3-3* und *C3-4* waren in allen drei Geweben deutlich höher exprimiert als *C3-1*, am größten war der Unterschied in den Kiemen. Die ähnliche Expression von *C3-3* und *C3-4* könnte auf eine engere Verwandtschaft und ähnliche Funktion dieser beiden Gene hinweisen und schlägt sich auch in deren Sequenzähnlichkeit nieder. *C3-1* zeigt zu *C3-3* und *C3-4* jeweils 62 und 58% Übereinstimmung (Proteinebene: 55 und 54%), während *C3-3* und *C3-4* zu 82% übereinstimmen (Proteinebene: 76%). *C3-1* ist möglicherweise in anderen, innerhalb dieser Arbeit nicht untersuchten Geweben stärker exprimiert. Die cDNA-Sequenz von *C3-1* ist der des Menschen mit 53% am ähnlichsten, *C3-3* und *C3-4* zeigen aber mit 52 und 50% eine ähnliche Übereinstimmung. Nach Infektion zeigte *C3-1* in den Kiemen eine stärkere Reaktivität im Verlaufe der Infektion, wobei durch den starken Anstieg nach drei Tagen lediglich das Grundexpressionsniveau von *C3-3* und *C3-4* erreicht wurde. Diese beiden Gene zeigten jedoch

zu keinem der gemessenen Zeitpunkte einen signifikanten Expressionsunterschied. Trotzdem könnten diese beiden Faktoren, aufgrund ihrer hohen Expression, eine ebenfalls wichtige Rolle spielen. Sunyer *et al.* (1996) gelangen bereits der Nachweis und die Charakterisierung der verschiedenen Bindeeigenschaften der C3-Isoformen. C3-1 zeigte ähnliche Eigenschaften wie das C3-Molekül des Menschen und konnte als einzige Isoform Zymosan binden. Außerdem scheint dieser Form eine spezialisierte Rolle im klassischen Weg zuzukommen. C3-3 und C3-4 hingegen zeigten keine Unterschiede in ihren Bindeeigenschaften von Hasen- und Schaferythrozyten. Auch für zwei C4-Komponenten im Säuger ist ein solcher Mechanismus bekannt (Dodds und Law, 1990). *C3-1* zeigte stets ein differentes Expressionsniveau in den Organen bzw. Reaktion nach Infektion im Vergleich zu *C3-3* und *C3-4*, wodurch die bereits hypothetisierte Theorie, dass das Pathogenerkennungs-Spektrum in Knochenfischen durch die drei C3-Isoformen erweitert wurde, angenommen werden kann.

Auch *CFB1* und *CFB2* zeigten differente Expressionsmuster. *CFB2* war in Milz und Kiemen höher exprimiert (ca. 10 bzw. 2-fach), in der Leber allerdings etwas geringer als *CFB1*. Die beiden Gene zeigen 81% Sequenzähnlichkeit, auf Proteinebene besteht eine 72%-ige Übereinstimmung. Beide Gene zeigen auch große Sequenzähnlichkeit zu *C2* (ca. 30%). Sunyer *et al.* (1998) konnten zeigen, dass *CFB2* nicht nur im alternativen, sondern auch im klassischen Weg des Komplementsystems agiert und demnach mglw. auch die Rolle von *C2* übernehmen kann. Nach Infektion in den Kiemen zeigte keines der beiden Gene eine signifikant veränderte Expression.

Ein besonders großer Expressionsunterschied bestand zwischen *C7-1* und *C7-2* in der Milz. *C7-2* war mit ca. $3.6x10^6$ Kopien/1µg RNA deutlich höher exprimiert als *C7-1* mit ca. 9300 Kopien/1µg RNA (670-fach in TCO, 350-fach in BORN). Dieses Ergebnis stimmt nicht überein mit dem von Papanastasiou und Zarkadis (2005), die *C7-1* als gar nicht exprimiert in der Milz beschrieben. In Kiemen und Leber war auch *C7-2* kaum exprimiert, trotzdem in beiden Fällen höher als *C7-1*. Eine starke Aufregulation wurde für *C7-1* in den Kiemen nach dreitägiger Infektion in den Kiemen ermittelt, während *C7-2* lediglich leicht schwankte. Peatman *et al.* (2008) fanden eine starke Aufregulation des *C7-1*-Homologs in der Leber vom Wels nach drei Tagen. Gerwick *et al.* (2007) hingegen zeigten einen Expressionsanstieg für *C7-2* nach einem Tag einer *Listonella (Vibrio) anguillarum*-Infektion in der Leber von Regenbogenforellen, was stark auf gewebespezifische Abwehrmechanismen von *C7-1* und *C7-2* hindeutet.

Auch für *CD59-1* und *CD59-2*, welche für die negativen Regulatoren des Membranangriffskomplexes kodieren, wurden unterschiedliche Transkriptzahlen ermittelt. In allen drei getesteten Geweben war *CD59-1* jeweils stärker exprimiert als *CD59-2*, der deutlichste Unterschied bestand in der Milz (ca. 40-fach). Interessanterweise beschrieben Papanastasiou *et al.* (2007) *CD59-1* als nicht exprimiert in der Milz, welches innerhalb dieser Arbeit aber mit 1.5 $x10^7$ ermittelten Kopien/1 µg RNA zu den höchst exprimierten Komplementgenen in der Milz zählt. Auffällig war auch der jeweils signifikante Expressionsunterschied von *CD59-1* in den Kiemen bzw. *CD59-2* in der Leber zwischen den beiden Stämmen. Im Verlaufe der Infektion zeigte sich tendenziell aber ein ähnlicher Expressionsverlauf beider Gene. Unterschiedlich war die Expression nur nach sechs Stunden, wobei *CD59-1* in beiden Stämmen zunächst stark herabreguliert wurde.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse nicht nur gewebespezifische Unterschiede in der Grundexpression sondern auch differente Expressionen nach Pathogeneinfluss in den Kiemen sowie auch Unterschiede zwischen den Stämmen. Regenbogenforellen haben demnach offensichtlich die Möglichkeit entwickelt, vielfältiger als Säuger auf Pathogene oder allgemein Stress zu reagieren.

6. AUSBLICK

Zur weiterführenden Charakterisierung der Regenbogenforellen der Stämme TCO und BORN soll eine vergleichende Transkriptomsequenzierung verschiedener Organe zur Identifizierung von *Single Nucleotide Polymorphismen* (SNPs) und somit zur Identifizierung neuer Kandidatengene beitragen, u.a. für eine weitere Charakterisierung des Immunsystems. Gezielte Sequenzabgleiche von bereits in dieser Arbeit identifizierten Kandidatengenen sollen ebenfalls zur SNP-Analyse erfolgen. Untersucht werden sollen Promotor- und Intronbereiche, um Hinweise auf differente Expressionsmechanismen zwischen beiden Stämmen sowie mögliche Konsequenzen für die hypothetische Proteinstruktur zu erhalten. Solche Ergebnisse können dazu beitragen, besonders geeignete Laicher für ein Fortführen der Zuchtlinie BORN zu identifizieren.

Aktuell findet bereits ein weiteres *in vivo*-Stressexperiment mit variierter Besatzdichte statt, in dessen Rahmen auch die Expression der in dieser Arbeit beschriebenen Kandidatengene zur Analyse beider Forellenstämme dienen soll. Zudem sind Experimente mit kombiniertem Stress wie Infektion und Temperaturveränderung und/oder veränderter Besatzdichte in Planung, um die Auswahl von Top-Expressoren noch weiter einzugrenzen. Gene wie *MBL2*, *C3-1* und *C7-1*, für die innerhalb dieser Arbeit bereits linienspezifische Expressionen während einer Infektion gezeigt wurden, können dafür als molekulares Testsystem gezielt genutzt werden.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten für Züchter verschiedenster Produktionsfische in offenen Teichanlagen von Nutzen sein, um robuste und standortgerechte Zuchtlinien zu entwickeln bzw. geeignete Laicher für Nachzuchten zu identifizieren.

Das innerhalb dieser Arbeit untersuchte Zellmodell RTgill-W1 ist geeignet für *in vitro*-Untersuchungen der Komplementgene und bietet Potenzial für Expressionsanalysen mit (kombinierten) Stressparametern. Auch funktionale Untersuchungen der in dieser Arbeit beschriebenen Kandidatengene, wie z.B. *ST2L* und *IRAK3*, hinsichtlich der Lokalisation und Interaktion ihrer Genprodukte innerhalb der Zelle, erfolgen bereits.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Aufklärung von Immunmechanismen der Regenbogenforelle. Hauptziel war es, immunrelevante Gene zu identifizieren, die an besonders frühen Abwehrmechanismen beteiligt sind. Dazu erfolgte zunächst eine holistische Transkriptomanalyse, die 802 geringer exprimierte Gene (FC $\geq$ 1.5, p $\leq$ 0.001) in der Milz gesunder BORN-Forellen gegenüber handelsüblicher Importforellen (TCO) identifizierte. 9% dieser Gene wurden immunrelevanten Mechanismen zugeordnet, von denen 13 Gene für funktionale Analysen ausgewählt wurden. Für die in der Regenbogenforelle noch nicht beschriebenen immunrelevanten Gene *ST2L*, *IRAK3*, *MARCH3*, *TCBP1*, *TCBP2*, *CLEC4M*, *CLEC4M-1*, *CD93* und *CFD* wurde sowohl die cDNA-Sequenz aufgeklärt und annotiert als auch phylogenetische Analysen durchgeführt. Für die Gene *TCBP1* und *CLEC4M* erfolgte zusätzlich der Nachweis von mindestens fünf bzw. zwei Transkriptvarianten mittels reversem *Northern Blot*. Aufgrund der Beteiligung einiger dieser Gene am Komplementsystem wurden nachfolgende Expressionsanalysen auf alle bisher in der Regenbogenforelle bekannten Komplementgene und potenzielle Initiatoren der Komplementkaskade ausgeweitet.

Generell konnte eine biologisch signifikante Expression der meisten Gene in Milz und Kiemen festgestellt werden, wobei vor allem in der Milz, aber auch teilweise in den Kiemen für viele Gene ein signifikant geringeres Expressionsniveau im Forellenstamm BORN im Vergleich zum Stamm TCO ermittelt wurde. Insgesamt wurde in der Leber der Regenbogenforelle das generell höchste Expressionsniveau ermittelt, in den Kiemen war dieses am geringsten. Die Gene *CLEC4M/-1*, *C1q*, *MBL2*, *CFD*, *C6* und *C7-2* waren in der Milz, *C1q* und *CFD* in den Kiemen jedoch stärker exprimiert als in der Leber, welche als Hauptsyntheseort für Komplementkomponenten im Säuger gilt. Erwartungsgemäß hoch war die Expression von Genen der Akuten Phase, wie *TCBP1*, *TCBP2*, *CFB-1*, *C3-3* und *C3-4*, in der Leber.

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Immunkompetenz der Kiemen in der Regenbogenforelle gezeigt werden. Nach einer im Tierexperiment durchgeführten intraperitonealen *A. salmonicida*-Infektion mit einer Dosis von 10^4 KBE erfolgte eine starke signifikante Regulation von Genen des klassischen und Lektin-Wegs im Stamm BORN, während in den TCO-Forellen insgesamt wenige signifikante Expressionsveränderungen auszumachen waren. Während Gene, die für potenzielle Initiatoren kodieren, weitestgehend in beiden Stämmen unreguliert blieben, wurden vor allem *C3-1*, *MBL2* und *C7-1* teilweise stark aufreguliert im Stamm BORN. Beachtlich war

auch die Aktivität von Genen im Stamm BORN, die für Regulatoren kodieren, wohingegen in TCO kaum Expressionsunterschiede dieser Gene vorlagen. Insgesamt zeigten die Expressionsdaten nach der Infektion zum einen eine linienspezifische Genaktivität und zum anderen lassen sie vermuten, dass Forellen des Stamms BORN einige Komponenten des Komplementsystems effektiver aktivieren können. Der Nachweis differenter Genexpressionen der duplizierten Gene *C3*, *CFB*, *C7* und *CD59* in gesunden Geweben (Leber, Milz, Kiemen) sowie nach Pathogeneinfluss in den Kiemen deutet auf eine den Säugern gegenüber erhöhte Diversität des Komplementsystems hin.

Auch der Nachweis der Eignung der bisher immunologisch kaum untersuchten Zelllinie RTgill-W1 für begleitende *in vitro*-Stressexperimente konnte in der vorliegenden Arbeit erbracht werden. Die Grundexpression der meisten Gene wurde nachgewiesen. Außerdem zeigte sich für die Gene *TCBP1*, *CLEC4M-1*, *C1q*, *C3-3*, *C4*, *MASP2* und *CFD* eine teilweise starke Aufregulation nach einer 24-stündigen *A. salmonicida*-Stimulation.

8. DANKSAGUNG

9. LITERATUR

Agius, C., Roberts, R.J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26:499-509.

Allendorf, F. W., Thorgaard, G.H. (1984) Evolutionary genetics of fishes. *Plenum Press*, *New York & London*. 1-53.

Alper, C.A., Johnson, A.M., Birtch, A.G., Moore, F.D. (1969) Human C3 - Evidence for Liver As Primary Site of Synthesis. *Science* 163:286-88.

Amrani, N., Sachs, M. S., Jacobson, A. (2006) Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:415-25.

Ananthakrishnan, R. (2007) The forces behind cell movement. *International Journal of Biological Sciences* 3:203-17.

Anders, E. (1986) Stand der Züchtung und Reproduktion brackwasseradaptierter Regenbogenforellenbestände im Küstenbereich der DDR. *Fischerei-Forschung Rostock* 24:72.

Anders, E. (2010) Vergleichende Phänotypanalysen zwischen der Regenbogenforellenlinie BORN und einer Importlinie. *Zwischenbericht des Inst. f. Fischerei in Born zum DIREFO-Projekt*

Andrews, P.A., Zhou, W.D., Sacks, S.H. (1995) Tissue Synthesis of Complement As An Immune Regulator. *Molecular Medicine Today* 1:202-07.

Arason, G.J. (1996) Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish & Shellfish Immunology* 6:277-289.

Asbakk, K. (2001) Elimination of foreign material by epidermal malpighian cells during wound healing in fish skin. *Journal of Fish Biology* 58:953-66.

Bayne, C.J., Gerwick, L., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T. (2001) Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, by means of suppression subtractive hybridization. *Developmental & Comparative Immunology* 25:205-17.

Bayne, C.J., Gerwick, L. (2001) The acute phase response and innate immunity of fish. Developmental & Comparative Immunology 25:725-743.

Benfey, T.J., Sutterlin, A.M. (1984) Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (Salmo salar L.) *Aquaculture* 36:359–67.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-23.

Black, S., Kushner, I., Samols D. (2004) C-reactive protein. Journal of Biological Chemistry 279, 48487-90.

Bly, J.E., Clem, L.W. (1992) Temperature and teleost immune functions. *Fish & Shellfish Immunology* 2:159-71.

Bols, N. (1994) Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* 17:601-11.

Boshra, H., Li, J., Peters, R., Hansen, J., Matlapudi, A., Sunyer, J.O. (2004) Cloning, expression, cellular distribution, and role in chemotaxis of a C5a receptor in rainbow trout: The first identification of a C5a receptor in a nonmammalian species. *Journal of Immunology* 172:4381-90.

Boshra, H., Petec, R., Li, J., Sunyer, J.O. (2004) Production of recombinant C5a from rainbow trout Oncorhynchus mykiss: role in leucocyte chemotaxis and respiratory burst. *Fish & Shellfish Immunology*17, 293-303.

Boshra, H., Wang, T.H., Hove-Madsen, L., Hansen, J., Li, J., Matlapudi, A., Secombes, C.J., Tort, L., Sunyer, J.O. (2005) Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and Xenopus: The first identification of C3a receptors in nonmammalian species. *Journal of Immunology* 175:2427-37.

Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., Corner, R. (2010) Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365:2897-912.

Bottazzi, B., Vouret-Craviari, V., Bastone, A., De Gioia, L., Matteucci, C., Peri, G., Mantovani, A. (1997) Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *Journal of Biological Chemistry* 272:32817–23.

Bowden, T.J., Cook, P., Rombout J. (2005) Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 19:413-27

Brint, E.K., Xu, D.M., Liu, H.Y., Dunne, A., McKenzie, A.N.J., O'Neill, L.A.J., Liew, F.Y. (2004) ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nature Immunology* 5:373-79.

Brudno, M., Gelfand, M.S, Spengler, S., Zorn, M., Dubchak, I., Conboy, J.G. (2001) Computational analysis of candidate intron regulatory elements for tissue-specific alternative pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Research* 29:2338-48.

Bruno, D.W. (1986) Furunculosis in sea-reared Atlantic salmon, Salmo salar L. Colonization of gill epithelium. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 76-80.

Buddington, R.K., Krogdahl, A., BakkeMcKellep, A.M. (1997) The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiologica Scandinavica* 161:67-80.

Burr, S.E., Pugovkin, D., Wahli, T., Segner, H., Frey, J. (2005) Attenuated virulence of an *Aeromonas* salmonicida subsp salmonicida type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology* 151:2111-18.

Campos-Perez, J.J., Ward, M., Grabowski, P.S., Ellis A.E., Secombes, C.J. (2000) The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout Oncorhynchus mykiss after challenge with the Gram-positive pathogen Renibacterium salmoninarum. *Immunology* 99:153-61.

Cao, Z.F., Huett, A., Kuballa, P., Giallourakis, C., Xavier, R.J. (2008) DLG1 is an anchor for the E3 ligase MARCH2 at sites of cell-cell contact. *Cellular Signalling* 20:73-82.

Carroll, M. (2004) The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology* 5:981-86.

Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., David, M., Andus, T., Geiger, R., Trullenque, R., Fabra, Heinrich, P.C. (1989) Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. - *FEBS letters* 242:237-39.

Castillo, M.G., Goodson, M.S., McFall-Ngai, M. (2009) Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid Euprymna scolopes. *Developmental & Comparative Immunology* 33:69-76.

Chen, J., Shi, Y.H., Li, M.Y., Ding, W.C., Niu, H. (2008) Molecular cloning of liver angiotensinogen gene in ayu (Plecoglossus altivelis) and mRNA expression changes upon Aeromonas hydrophila infection. *Fish & Shellfish Immunology* 24:659-62.

Chiller, J.M., Hodgins, H.O., Chambers, V.C., Weiser, R.S. (1969) Antibody Response in Rainbow Trout (Salmo Gairdneri) I. Immunocompetent Cells in Spleen and Anterior Kidney. *Journal of Immunology* 102:1193-1201

Chondrou, M., Papanastasiou, A.D., Spyroulias, G.A., Zarkadis, I.K. (2008) Three isoforms of complement properdin factor P in trout: Cloning, expression, gene organization and constrained modeling. *Developmental & Comparative Immunology* 32:1454-66.

Clemenza, L., Isenman, D.E. (2000) Structure-guided identification of C3d residues essential for its binding to complement receptor 2 (CD21). *Journal of Immunology* 165:3839-48.

Costa, G., Danz, H., Kataria, P., Bromage, E. (2012) A holistic view of the dynamisms of teleost IgM: A case study of Streptococcus iniae vaccinated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Developmental & Comparative Immunology* 36:298-305.

Costa, M.M., Maehr, T., Diaz-Rosales, P., Secombes, C.J., Wang, T. (2011) Bioactivity studies of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) interleukin-6: Effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Molecular Immunology* 48:1903-16.

Davis, A.E., Lu, F., Mejia, P. (2010) C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thrombosis & Haemostasis* 104:886-93.

de Bruijn, I. (2012) Immune gene expression in trout cell lines infected with the fish pathogenic oomycete Saprolegnia parasitica. *Developmental & Comparative Immunology* 38:44-54.

Delalande, J.M., Rescan, P.Y. (1999) Differential expression of two nonallelic MyoD genes in developing and adult myotomal musculature of the trout (Oncorhynchus mykiss) *Development Genes & Evolution* 209:432-37.

Diaz-Rosales, P., Bird, S., Wang, T., Fujiki, K., Davidson, W., Zou,J., Secombes, C. (2009) Rainbow trout interleukin-2: Cloning, expression and bioactivity analysis. *Fish & Shellfish Immunology* 27:414-22.

Dishaw, L.J., Smith, S.L., Bigger, C.H. (2005) Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. *Immunogenetics* 57:535-48.

Dodds, A.W., Law, S.K. (1990) The Complement Component C4 of Mammals. *Biochemical Journal* 265:495-502.

Duncan, S.C., Morgan, B. (2003) Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clinical Science* 104:455-66

Ellis, A.E. (1977) Ontogeny of the immune response in Salmo salar. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 87:421-23.

Esser, A.F. (1994) The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* 87:229-47.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P. (2005) The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85:97-177.

Ewart, K.V., Johnson, S.C., Ross, N.W. (1999) Identification of a pathogen-binding lectin in salmon serum. Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology *Toxicology & Endocrinology* 123:9-15.

Fänge, R, Nilsson, S. (1985) The fish spleen: structure and function. *Experientia* 45:152-58.
Fänge, R. (1986) Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). *Veterinary Immunology & Immunopathology* 12: 153-61.
FAO. (2012) The State of World Fisheries and Aquaculture, Rom:1-209.
Farries, T.C., Atkinson, J.P. (1991) Evolution of the complement system. *Immunology Today* 12:295–300
Fast, M.D., Sims, D.E., Burka, J.F., Mustafa, A., Ross, N.W. (2002) Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry & Physiology* 132:645-57.
Fernandez-Botran, R. (1991) Soluble Cytokine Receptors-Their Role in Immunoregulation. *Faseb Journal* 5:2567-74.
Fischer, U., Utke, K., Somamoto, T., Kollner, B., Ototake, M., Nakanishi, T. (2006) Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 20:209-26.
Frank, M.M., Fries, L.F. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology Today* 12: 322-26.
Friedman, R., Hughes, A.L. (2001) Pattern and timing of gene duplication in animal genome. *Genome Research* 11:1842-47.
Fujiki, K., Liu, L., Sundick, R.S., Dixon, B. (2003) Molecular cloning and characterization of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) C5a anaphylatoxin receptor. *Immunogenetics* 55:640-46.
Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y. (2004) The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews* 198:185-202.
Fukuda, H., Nakamura,N., Hirose, S. (2006) MARCH-III is a novel component of endosomes with properties similar to those of MARCH-II. *Journal of Biochemistry* 139:137-145.
Gal, P., Ambrus, G. (2001) Structure and function of complement activating enzyme complexes: C1 and MBL-MASPs. *Current Protein & Peptide Science* 2:43-59.
Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., Mantovani, A. (2005) Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annual Review of Immunology* 23:337-66.
Gasque, P. (2004) Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular Immunology* 41:1089-98.
Gatward, I., Corner, R. (2010) Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365:2897-912.
Geijtenbeek, T.B.H., Groot, P.C., Nolte, M.A., van Vliet, S.J., Gangaram-Panday, S.T., van Duijnhoven, G. C.F., Kraal, G., van Oosterhout, A.J.M., van Kooyk, Y. (2002) Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 100:2908-16.
Gerwick, L., Corley-Smith, G., Bayne, C.J. (2007) Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish & Shellfish Immunology* 22:157-71.
Gibson, U.E.M., Heid, C., Williams, P. (1996) A novel method for real time quantitative RT PCR. *Genome Research* 6:995-1001.
Gigli. I., Nelson, R.A. (1968) Complement Dependent Immune Phagocytosis .I. Requirements for C1 C4 C2 C3. *Experimental Cell Research* 51:45.
Gilbert, W. (1978) Why genes in pieces? *Nature* 271:501.
Goff, S. A. (2002) A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica) *Science* 296:92-100.
Graveley, B. R. (2001) Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genetics*. 17:100-07.
Grigoryev, Y. A., Kurian, S. M., Nakorchevskiy, A. A., Burke, J. P., Campbell, D., Head, S. R., Deng, J.,. Kantor, A. B, Yates, J. R., Salomon, D. R. (2009) Genome-Wide Analysis of Immune Activation in Human T and B Cells Reveals Distinct Classes of Alternatively Spliced Genes. *PloS one* 4.
Gustafson, C. (1992) Detection of Aeromonas salmonicida from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Applied & Environmantal Microbiology* 58:3816-25.
Hadidi, S. (2008) Spleen size predicts resistance of rainbow trout to Flavobacterium psychrophilum challenge. *American Association of Immunologists* 180:4156-65.
Hajela, K., Kojima, M., Ambrus, G., Wong, K.H., Moffatt, B.E., Ferluga, J., Hajela, S., Gal, P., Sim, R.B. (2002) The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs). *Immunobiology* 205:467-75.
Hansen, J.D., Landis, E.D., Phillips, R.B. (2005) Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:6919-24.
Hansen, J.D., Zapata, A.G. (1998) Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews* 166:199-220.

Harrison, R.A., Lachmann, P.J. (1980) The physiological breakdown of the third component of human complement. *Molecular Immunology* 17:9–20.

Harun, N.O., Wang, T., Secombes, C. (2011) Gene expression profiling in naive and vaccinated rainbow trout after Yersinia ruckeri infection: Insights into the mechanisms of protection seen in vaccinated fish. *Vaccine* 29:4388-99.

Hastein, T., Lindstad, T. (1991) Diseases in wild and cultured salmon: possible interaction. *Aquaculture* 98:277-88.

Haugarvoll, E., Bjerkas, I., Nowak, B.F., Hordvik, I., Koppang, E.O. (2008) Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon. *Journal of Anatomy* 213:202-09.

Holland, M.C.H., Lambris, J.D. (2002) The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 12:399-420.

Holland, M.C.H., Lambris, J.D. (2004) A functional C5a anaphylatoxin receptor in a teleost species. *Journal of Immunology* 172:349-55.

Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R.B., Jensenius, J.C. (1994) Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunology Today* 15:67-74.

Holzer, A.S., Sommerville, C., Wootten, R. (2003) Tracing the route of Sphaerospora truttae from the entry locus to the target organ of the host, Salmo salar L., using an optimized and specific in situ hybridization technique. *Journal of Fish Diseases* 26:647-55.

Hoover, G.J., El-Mowafi, A., Simko, E., Kocal, T.E., Ferguson, H.W., Hayes, M.A. (1998) Plasma proteins of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) isolated by binding to lipopolysaccharide from Aeromonas salmonicida. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 120:559-69.

Hordvik, I., Thevarajan, J., Samdal, I., Bastani, N., Krossoy, B. (1999) Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scandinavian Journal of Immunology* 50:202-10.

Iger, Y., Abraham, M. (1990) The process of skin healing in experimentally wounded carp. *Journal of Fish Biology* 36:421-37.

Janssens, S., Beyaert, R. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Molecular Cell* 11:293-302.

Jiang, H.X., Wagner, E., Zhang, H.M., Frank, M.M. (2001) Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *Journal of Experimental Medicine* 194:1609-16.

Jordan, I.K., Makarova, K.S., Spouge, J.L., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2001) Lineage-specific gene expansions in bacterial and archaeal genomes. *Genome Research* 11:555-65.

Jozsi, M., Oppermann,M., Lambris,J.D., Zipfel, P.F. (2007) The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Molecular Immunology* 44:2697-2706.

Kaattari, S., Evans, D., Klemer, J. (1998) Varied redox forms of teleost IgM: an alternative to isotypic diversity? *Immunological Reviews* 166:133-42.

Kaattari,S.L., Irwin, M.J. (1985) Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental & Comparative Immunology* 9:433-44.

Kaneta, J.-I., Masumi I., Koyanagi, Kanako, O., Watanabe, Hidemi (2009) Molecular evolutionary origins of the adaptive immune system in gnathostomata. *Genome Informatics*

Kerscher, O., Felberbaum, R., Hochstrasser, M. (2006) Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 22:159-180.

Kimura, A., Sakaguchi, E., Nonaka, M. (2009) Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, Nematostella vectensis. *Immunobiology* 214:165-78.

Kishore, U., Kojouharova, M.S., Reid, K.B.M. (2002) Recent progress in the understanding of the structure-function relationships of the globular head regions of C1q. *Immunobiology* 205:355-64.

Klickstein, L.B., Wong, W.W., Smith, J.A., Weis, J.H., Wilson, J.G., Fearon, D.T. (1987) Human C3b/C4b receptor (CR1). Demonstration of long homologous repeating domains that are composed of the short consensus repeats characteristics of C3/C4 binding proteins. *Journal of Experimental Medicine* 165:1095-112.

Kodama, H., Arimitsu, P. U., Mukamoto, M., Sugimoto, C. (1999) Enhancement of phagocytic and chemokinetic activities of rainbow trout head kidney cells by C-reactive protein. *American Journal of Veterinary Research* 60:240-44.

Köbis J.M., Rebl A., Kühn C., Goldammer T. (2013) Comparison of splenic transcriptome activity of two rainbow trout strains differing in robustness under regional aquaculture conditions. *Molecular Biology Reports* 40:1955-66.

Köllner, B., Kotterba, G. (2002) Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, after intraperitoneal immunisation with Aeromonas salmonicida. *Fish & Shellfish Immunology* 12:35-48.

Kohl, J. (2001) Anaphylatoxins and infectious and non-infectious inflammatory diseases. *Molecular Immunology* 38:175-87.

Koop, B.F. (2008) Genomics and the Genome Duplication in Salmonids. *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress:77-86.

Koppang, E.O., Fischer, U., Moore, L., Tranulis, M.A., Dijkstra, J.M., Kollner, B., Aune, L., Jirillo, E., Hordvik, I. (2010) Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy* 217:728-39

Korytář, T., Verleih, M., Rebl, R., Anders, E., Köllner, B., Goldammer, T. (2009) Investigation of genomic, transcriptomic and functional differences in the immune system of two different resistant rainbow trout strains-the DIREFO Project. *11th Conference of ISDCI*, Prag, Tschechien

Kraal, G. (2006) New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *International Review of Cytology* 250:175-215.

Kurtz, C.B., Otoole, E., Christensen, S.M., Weis, J.H. 1990. The murine complement receptor gene family. IV. Alternative splicing of Cr2 gene transcripts predicts two distinct gene products that share homologous domains with both human CR2 and CR1. *Journal of Immunology* 144:3581-91.

Laing, K.J., Hardie, L.J., Aartsen, W., Grabowski, P.S., Secombes, C.J. (1999) Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout O. mykiss. *Developmental & Comparative Immunology* 23:71-85.

Law, S.K., Lichtenberg, N.A., Levine, R.P. (1979) Evidence for an Ester Linkage between the Labile Binding Site of C3b and Receptive Surfaces. *Journal of Immunology* 123:1388-94.

Law, S.K., Dodds, A.W. (1997) The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Science* 6:263-74.

Lee, L.E.J. 2009. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. 45.

Le Friec G., Kemper, C. (2009) Complement: coming full circle. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 57:393-407.

Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P. (1998) Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology* 201:165-68.

Lesavre, P.H., Hugli, T.E., Esser, A.F., Müller-Eberhard, H.J. (1979) The alternative pathway C3/C5 convertase: chemical basis of factor B activation. *Journal of Immunology* 123:529–34.

Liew, F.Y., Xu,D.M., Brint, E.K., O'Neill, L.A.J. (2005) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature Reviews Immunology* 5:446-58.

Lipkowitz, S., Weissman, A.M. (2011) RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nature Reviews Cancer* 11:629-43.

Lodemel, J.B., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E., Espelid, S., Ringo, E. (2001) Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (Salvelinus alpinus L.) during cohabitant challenge with Aeromonas salmonicida ssp salmonicida. *Aquaculture Research* 32:935-45.

Lovoll, M., Dalmo, R.A., Bogwald, J. (2007) Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Fish & Shellfish Immunology* 23, 721-31.

Lukacik, P., Roversi, P., White, J., Esser, D., Smith, G.P., Lea, S.M. (2004) Complement regulation at the molecular level: The structure of decay-accelerating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:1279-84.

Lynch, K.W. 2004. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nature Reviews Immunology* 4:931-40.

Lynch, M. (2001) The molecular natural history of the human genome. *Trends in Ecology & Evolution* 16:420-22.

Lynch, M., Conery, J.S. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290:1151-55.

Maisey, K., Imarai, M. (2011) Diversity of teleost leukocyte molecules: Role of alternative splicing. *Fish & Shellfish Immunology* 31:663-72.

Matsunaga, T., Rahman, A. (2001) In search of the origin of the thymus: the thymus and GALT may be evolutionarily related. *Scandinavian Journal of Immunology* 53:1-6.

Matsushita, M., Thiel, S., Jensenius, J.C., Terai, I., Fujita, T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *Journal of Immunology* 165:2637-42.

Mebius, R.E., Kraal, G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology* 5:606-16.

Meseguer, M., Lopez-Ruiz, A., Garcia-Ayala, A. (1995) Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (Sparus aurata L.): an ultrastructural and cytochemical study. *Anatomical Record* 241:303-09.

Mikrou, A., Marioli, D., Papanastasiou, A.D., Zarkadis, I.K. (2009) CR3 complement receptor: Cloning and characterization in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 26:19-28.

Miller, N., Wilson, M., Bengten, E., Stuge, T., Warr, G., Clem, W. (1998) Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological Reviews* 166:187-97.

Modrek, B. (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* 30:13-19.

Molina, H. (2004) Complement and immunity. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 30:1-18.

Moltenius, H. (1970) Die Funktion der Milz im Rahmen des RES. *Die Milz* (ed.by K. Lennert und D.Harms). *Springer-Verlag*, Berlin, 145-61.

Monteiro, S.M., Oliveira, E., Fontainhas-Fernandes, A., Sousa, M. (2010) Fine Structure of the Branchial Epithelium in the Teleost Oreochromis niloticus. *Journal of Morphology* 271:621-33.

Morgan, B.P., Gasque, P. (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: Where, when and why? *Clinical & Experimental Immunology* 107:1-7.

Mosley, B., Beckmann, M.P, March., C.J., Idzerda, R.L., Gimpel, S.D., Vandenbos, T., Friend, D., Alpert, A., Anderson, D., Jackson, J., Wignall, J.M., Smith, C., Gallis, B., Sims, J.E., Urdal, D., Widmer, M.B., Cosman, D., Park, L.S. (1989) The Murine Interleukin-4 Receptor - Molecular-Cloning and Characterization of Secreted and Membrane-Bound Forms. *Cell* 59:335-48.

Mulder, I.E., Wadsworth, S., Secombes, C.J. (2007) Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during infection with Aeromonas salmonicida. *Fish & Shellfish Immunology* 23:747-59.

Murata, M., Kodama, H., Onuma, M. (1995) Characterization of rainbow trout c-polysaccharide binding proteins. *Journal of Veterinary Medical Science* 57:419-25.

Nakamura, N., Fukuda, H., Kato, A., Hirose, S. (2005) MARCH-II is a syntaxin-6-binding protein involved in endosomal trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 16:1696-1710.

Nakanishi, Y., Kodama, H., Murai, T., Mikami, T., Izawa, H. (1991) Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *American Journal of Veterinary Research* 52:397-401.

Nakao M., Tsujikura, M., Ichiki, S., Vo, T.K., Somamoto, T. (2011) The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. *Developmental & Comparative Immunology* 35:1296-308.

Nathan, J.A., Lehner, P.J. (2009) The trafficking and regulation of membrane receptors by the RING-CH ubiquitin E3 ligases. *Experimental Cell Research* 315:1593-1600.

Nauta, A.J., Bottazzi, B., Mantovani, A., Salvatori, G., Kishore, U., Schwaeble, W.J., Gingras, A.R., Tzima, S., Vivanco, F., Egido, J., Tijsma, O., Hack, E.C., Daha, M.R., Roos, A. (2003) Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *European Journal of Immunology* 33:465-73.

Nauta, A.J., Daha, M.R., Tijsma, O., Van de Water, B., Tedesco, F., Roos, A. (2002) The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *European Journal of Immunology* 32:783-92.

Nayak, A., Pednekar, L., Reid, K.B.M., Kishore, U. (2012) Complement and non-complement activating functions of C1q: A prototypical innate immune molecule. *Innate Immunity* 18:350-63.

Nikolakopoulou, K., Zarkadis,K. (2006) Molecular cloning and characterisation of two homologues of Mannose-Binding Lectin in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 21:305-14.

Nikoskelainen, S., Bylund, G., Lilius E.M. (2004) Effect of environmental temperature on rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) innate immunity. *Developmental & Comparative Immunology* 28:581-92.

Nonaka, M., Kimura, A. (2006) Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* 58:701-13.

Nonaka, M., Nonaka, M., Irie, M., Tanabe, K., Kaidoh, T., Natsuumesakai, S., Takahashi, M. (1985) Identification and characterization of a varinat of the 3rd component of complement (C3) in rainbow trout (Salmo Gairdneri) serum. *Journal of Biological Chemistry* 260:809-15.

Novak, A.E. 2006. Gene duplications and evolution of vertebrate voltage-gated sodium channels. 63:14.

Odegard, J., Baranski, M., Gjerde, B., Gjedrem, T. (2011) Methodology for genetic evaluation of disease resistance in aquaculture species: challenges and future prospects. *Aquaculture Research* 42:103-14.

Ohmura-Hoshino, M. 2006. A novel family of membrane-bound E3 ubiquitin ligases. *Journal of Biochemestry* 140:147-154.

Ohno, S. (1970) *Evolution by gene duplication* (ISBN:0-04-575015-7)

Olsvik, P.A., Lie, K.K., Jordal, A.E.O., Nilsen, T.O., Hordvik, I. (2005) Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology* 6:21.

Oltvai, Z.N., Wong, E., Atkinson, J.P., Tung, K. (1991) Biology of disease-C1 inhibitor deficiency molecular and immunological basis of hereditary and acquired angioedema *Laboratory Investigation* 65:381-88.

O'Neill, L., Bowie, A. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology* 7:353-64.

Pangburn, M.K., Rawal, N. (2002) Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochemical Society Transactions* 30:1006-10.

Papanastasiou, A.D., Georgaka, E., Zarkadis, I.K. (2007) Cloning of a CD59-like gene in rainbow trout - Expression and phylogenetic analysis of two isoforms. *Molecular Immunology* 44:1300-06.

Papanastasiou, A.D., Zarkadis, I.K. (2005) Gene duplication of the seventh component of complement in rainbow trout. *Immunogenetics* 57:703-08.

Papanastasiou, A.D., Zarkadis, I.K. (2006) Cloning and phylogenetic analysis of the alpha subunit of the eighth complement component (C8) in rainbow trout. *Molecular Immunology* 43:2188-94.

Papanastasiou, A.D., Georgaka, E., Zarkadis, I.K. (2007) Cloning of a CD59-like gene in rainbow trout - Expression and phylogenetic analysis of two isoforms. *Molecular Immunology* 44:1300-06.

Peatman, E., Terhune, J., Baoprasertkul, P., Xu, P., Nandi, S., Wang, S., Somridhivej, B., Kucuktas, H., Li, P., Dunham, R., Liu, **Z.** (2008) Microarray analysis of gene expression in the blue catfish liver reveals early activation of the MHC class I pathway after infection with Edwardsiella ictaluri. *Molecular Immunology* 45:553-66.

Peleteiro, M.C., Richards, R.H. (1988) Immunocytochemical studies on immunoglobulin-containing cells in the epidermis of rainbow trout Salmo gairdneri Richardson: influence of bath vaccination. *Journal of Fish Biology* 32:845-58.

Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W., Wardlaw, A.C. (1954) The properdin system and immunity: I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *American Association for the Advancement of Science* 120:279-85.

Press, C.M., Evensen, O. (1999) The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology* 9:309-18.

Purcell, M.K., Kurath, G., Garver, K.A., Herwig, R.P., Winton, J.R. (2004) Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoletic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 17:447-62.

Purcell, M. K., Laing, K.J., Woodson, J.C., Thorgaard, G.H., Hansen, J.D. (2009) Characterization of the interferon genes in homozygous rainbow trout reveals two novel genes, alternate splicing and differential regulation of duplicated genes. *Fish & Shellfish Immunology* 26:293-304.

Putnam, F. (1985) Alpha, beta, gamma, omega - the structure of the plasma proteins. In: The plasma proteins; structure, function and genetic control (ed. by FW P) *London: Academic Press* 146 - 67.

Quesada, J., Villena, M.I., Agulleiro, B. (1990) Structure of the Spleen of the Sea Bass (Dicentrarchus-Labrax) - A Light and Electron-Microscopic Study. *Journal of Morphology* 206:273-81.

Rasmussen, A.S., Arnason, U. (1999) Molecular studies suggest that cartilaginous fishes have a terminal position in the piscine tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:2177-82.

Rebl, A., Siegl, E., Koellner, B., Fischer, U., Seyfert, H.M. (2007) Characterization of twin toll-like receptors from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Evolutionary relationship and induced expression by Aeromonas salmonicida salmonicida. *Developmental & Comparative Immunology* 31:499-510.

Rebl, A., Kobis, J.M., Fischer, U., Takizawa, F., Verleih, M., Wimmers, K., Goldammer, T. (2011) MARCH5 gene is duplicated in rainbow trout, but only fish-specific gene copy is up-regulated after VHSV infection. *Fish & Shellfish Immunology* 31:1041-50.

Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H.M. (2010) Toll-like receptor signaling in bony fish. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 134:139-150.

Rebl, A., Verleih, M., Korytář, T., Kühn, C., Wimmers, K., Köllner, B., Goldammer, T. (2012) Identification of differentially expressed protective genes in liver of two rainbow trout strains. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 145:305-15.

Rebl, A., Verleih, M., Köbis, J.M., Kühn, C., Wimmers, K., Köllner, B., Goldammer, T. (2013) Transcriptome profiling of gill tissue in regionally bred and globally farmed rainbow trout strains reveals different strategies coping with thermal stress. Marine Biotechnology: DOI: 10.1007/s10126-013-9501-8.

Rijkers, G.T., Frederixwolters, E.M.H., Van Muiswinkel, W.B. (1980) The immune system of cyprinid fish. Kinetics and temperature dependence of antibody-producing cells in carp (Cyprinus carpio). *Immunology* 41:91-97.

Ringo, E., Jutfelt, F., Kanapathippillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E. (2004) Damaging effect of the fish pathogen Aeromonas salmonicida ssp salmonicida on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Cell & Tissue Research* 318:305-12.

Rolfe, D.F.S., Brown, G.C. (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological Reviews* 77:731-58.

Rollins, S.A., Sims, P.J. (1990) The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *Journal of Immunology* 144:3478-83.

Rotllant, J., Parra, D., Peters, R., Boshra, H., Sunyer, J.O. (2004) Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: Role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst. *Developmental & Comparative Immunology* 28:815-28.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H.A. (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of Dna with A Thermostable Dna-Polymerase. *Science* 239:487-91.

Salinas, I., Zhang, Y.A., Sunyer, J.O. (2011) Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology* 35:1346-65.

Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology & Evolution* 4:406-25.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2.

Secombes, C. (2008) Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish & Shellfish Immunology* 25:409-16.

Seyfarth, J., Garred, P., Madsen, H.O. (2006) Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (mbl2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. Molecular Immunology 43:962-971.

Shi, H. X., Liu, X., Wang, Q., Tang, P.P., Liu, X.Y., Shan, Y.F., Wang, C. (2011) Mitochondrial Ubiquitin Ligase MARCH5 Promotes TLR7 Signaling by Attenuating TANK Action. *Plos Pathogens* 7:e1002057. doi:10.1371/journal.ppat.1002057.

Sim R., Laich, A. (2000) Serine proteases of the complement system. *Biochemical Society Transactions* 28:545-50.

Snieszko, S. E., Bullock, G.L. (1975) Fish furunculosis. *U.S. Fish and Wildl. Serv.Fish Dis. Leafl.* 43:10.

Spring, J. (1997) Hypothesis vertebrate evolution by interspecific hybridisation - Are we polyploid? *Febs Letters* 400:2-8.

Stet, R.J.M., Kruiswijk, C.P., Dixon, B. (2003) Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fishes: The road not taken. *Critical Reviews in Immunology* 23:441-71.

Stuyver, L.J., Whitaker, T., McBrayer, T.R., Hernandez-Santiago, B.I., Lostia, S., Tharnish, P.M., Ramesh, M., Chu, C.K., Jordan, R., Shi, J.X., Rachakonda, S., Watanabe, K.A., Otto, M.J., Schinazi, R.F. (2003) Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 47:244-54.

Sunyer, J.O., Tort, L. (1995a) Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream Sparus aurata serum are effected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 45:333-45.

Sunyer, J.O., Gomez, E., Navarro, V., Quesada, J., Tort, L. (1995b) Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead sea bream (Sparus aurata) following daily acute stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52:2339-46.

Sunyer J.O., Zarkadis I.K., Sahu A., Lambris, J.D. (1996) Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:8546-51.

Sunyer, J.O., Tort, L., Lambris, J.D. (1997) Diversity of the third form of complement, C3, in fish: Functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish Sparus aurata. *Biochemical Journal* 326:877-81.

Sunyer, J.O., Zarkadis, I., Sarria,s M.R., Hansen, J.D., Lambris, J.D. (1998a) Cloning, structure, and function of two rainbow trout Bf molecules. *Journal of Immunology* 161:4106-14.

Sunyer, J.O., Lambris, J.D. (1998b) Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunological Reviews* 166:39-57.

Sunyer, J.O., Zarkadis, I., Lambris, J.D. (1998c) Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity. *Immunology Today* 19:519-23.

Sunyer, J.O., Boshra, H., Lorenzo, G., Parra, D., Freedman, B., Bosch, N. (2003) Evolution of complement as an effector system in innate and adaptive immunity. *Immunologic Research* 27:549-64.

Takizawa, F., Koppang, E.O., Ohtani, M., Nakanishi, T., Hashimoto, K., Fischer, U., Dijkstra, J.M. (2011) Constitutive high expression of interleukin-4/13A and GATA-3 in gill and skin of salmonid fishes suggests that these tissues form Th2-skewed immune environments. *Molecular Immunology* 48:1360-68.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology & Evolution* 24:1596-99.

Tanne, A., Ma, B., Boudou, F., Tailleux, L., Botella, H., Badell, E., Levillain, F., Taylor, M.E., Drickamer, K., Nigou, J., Dobos, K.M., Puzo, G., Vestweber, D., Wild, M.K., Marcinko, M., Sobieszczuk, P., Stewart, L., Lebus, D., Gicquel, B., Neyrolles, O. (2009) A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine* 206:2205-20.

Taylor, J.S., Van de Peer, Y., Braasch, I., Meyer, A. (2001) Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 356:1661-79.

Teles, M., Mackenzie, S., Boltana, S., Callol, A., Tort, L. (2011) Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 30:340-46.

Tenner, A.J., Volkin, D.B. (1986) Complement Subcomponent-C1Q Secreted by Cultured Human-Monocytes Has Subunit Structure Identical with That of Serum-C1Q. *Biochemical Journal* 233:451-58.

Thompson, D., Pepys, M.B., Wood, S.P. (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure with Folding & Design* 7:169-177.

Trepicchio, W.L., Dorner, A.J. (1998) The therapeutic utility of Interleukin-11 in the treatment of inflammatory disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 7:1501-04.

Trueb, B., Neuhauss, S.C.F., Baertschi, S., Rieckmann, T., Schild, C., Taeschler, S. (2005) Fish possess multiple copies of fgfrll, the gene for a novel FGF receptor. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure & Expression* 1727:65-74.

Turner, M.W. (1996) Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today* 17:532-40.

van Breukelen, F., Martin, S.L. (2002) Reversible depression of transcription during hibernation. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic & Environmental Physiology* 172:355-61.

Van Muiswinkel, W.B, Lamers, C.H.J., Rombout, J. (1991) Structural and Functional Aspects of the Spleen in Bony Fish. *Research in Immunology* 142:362-66.

Vasta, G.R., Nita-Lazar, M., Giomarell,i B., Ahmed, H., Du, S., Cammarata, M., Parrinello, N., Bianchet, M.A., Amzel, L.M. (2011) Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. *Developmental & Comparative Immunology* 35:1388-99.

Vision, T.J., Brown, D.G., Tanksley, S.D. (2000) The origins of genomic duplications in Arabidopsis. *Science* 290:2114-17.

von Schalburg, K.R., Cooper, G.A., Leong, J., Robb, A., Lieph, R., Rise, M.L., Davidson, W.S., Koop, B.F. (2008) Expansion of the genomics research on Atlantic salmon Salmo salar L. project (GRASP) microarray tools. *Journal of Fish Biology* 72:2051-70.

Wang, W., Zhang, M., Sun, L. (2011) Ferritin M of Cynoglossus semilaevis: An iron-binding protein and a broad-spectrum antimicrobial that depends on the integrity of the ferroxidase center and nucleation center for biological activity. *Fish & Shellfish Immunology* 31:269-274.

Wang, W., Zhou, Z., He, S., Liu, Y., Cao, Y., Shi, P., Yao, B., Ringo, E. (2010) Identification of the adherent microbiota on the gills and skin of poly-cultured gibel carp (Carassius auratus gibelio) and bluntnose black bream (Megalobrama amblycephala Yih). *Aquaculture Research* 41:72-83.

Wang, Y.F., Gu, X. (2000) Evolutionary patterns of gene families generated in the early stage of vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 51:88-96.

Wardle, C.S. (1971) New observations on the lymph system of the plaice Pleuronectes platessa and other teleosts. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51:977-90.

Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M. (2001) Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal* 79:570-74.

Weiler, J.M., Daha, M.R., Austen, K.F., Fearon, D.T. (1976) Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73:3268-72.

Wesche, H., Gao, X., Li, X.X., Kirschning, C.J., Stark, G.R., Cao, Z.D. (1999) IRAK-M is a novel member of the pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *Journal of Biological Chemistry* 274:19403-10.

White, R.T., Damm, D., Hancock, N., Rosen, B.S., Lowell, B.B., Usher, P., Flier, J.S., Spiegelman, B.M. (1992a) Human Adipsin Is Identical to Complement Factor-D and Is Expressed at High-Levels in Adipose-Tissue. *Journal of Biological Chemistry* 267:9210-13.

Wilson, D.E., Reeder, D.M. (2005). Mammal species of the world. Baltimore: Johns Hopkins University Press

Wilson, J.M., Laurent, P. (2002) Fish gill morphology: Inside out. *Journal of Experimental Zoology* 293:192-213.

Wilson, M., Bengten, E., Miller, N.W., Clem, L.W., DuPasquier, L., Warr, G.W. (1997) A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4593-97.

Wolfe, K.H. (2001) Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics* 2:333-41.

Wolfe, K.H., Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387:708-13.

Wurzner, R., Joysey, V.C., Lachmann, P.J. (1994) Complement Component C7 - Assessment of In-Vivo Synthesis After Liver- Transplantation Reveals That Hepatocytes do Not Synthesize the Majority of Human C7. *Journal of Immunology* 152:4624-29.

Xu, Y.Y., Narayana, S.V.L., Volanakis, J.E. (2001) Structural biology of the alternative pathway convertase. *Immunological Reviews* 180:123-35.

Yakubenko, V.P., Lishko, V.K., Lam, S.C.T., Ugarova, T.P. (2002) A molecular basis for integrin alpha(M)beta(2) ligand binding promiscuity. *Journal of Biological Chemistry* 277:48635-42.

Yang, H., Wang, H.C., Czura, C.J., Tracey, K.J. (2005) The cytokine activity of HMGB1. *Journal of Leukocyte Biology* 78:1-8.

Zapata, A. (1979) Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Developmental & Comparative Immunology* 3:55-65.

Zapta, A., Diez, B., Cejalvo, T., Frias, C.G., Cortes, A. (2006) Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20:126-36.

Zarkadis, I.K., Sarrias, M.R., Sfyroera, G., Sunyer, J.O., Lambris, J.D. (2001) Cloning and structure of three rainbow trout C3 molecules: a plausible explanation for their functional diversity. *Developmental & Comparative Immunology* 25:11-24.

Zhang, Y.A., Salinas, I., Sunyer, J.O. (2011) Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish & Shellfish Immunology* 31:627-34.

Zhou, Z., Liu, H., Liu, S., Sun, F., Peatman, E., Kucuktas, H., Kaltenboeck, L., Feng, T., Zhang, H., Niu, D., Lu, J., Waldbieser, G., Liu, Z. (2012) Alternative complement pathway of channel catfish (Ictalurus punctatus): Molecular characterization, mapping and expression analysis of factors Bf/C2 and Df. *Fish & Shellfish Immunology* 32:186-95.

Zhu, L., Nie, L., Zhua, G., Xianga, L., Shao, J. (2012) Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Developmental & Comparative Immunology* 39: 39-62.

Zou J., Cunningham, C., Secombes, C.J. (1999) The rainbow trout Oncorhynchus mykiss interleukin-1 beta gene has a different organization to mammals and undergoes incomplete splicing. *European Journal of Biochemistry* 259:901-08.

Zundel, S., Cseh, S., Lacroix, M., Dahl, M.R., Matsushita, M., Andrieu, J.P., Schwaeble, W.J., Jensenius, J.C., Fujita, T., Arlaud, G.J., Thielens, N.M. (2004) Characterization of recombinant mannan-binding lectin associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2. *Journal of Immunology* 172:4342-50.

ANHANG

A Weitere Materialien

Verbrauchsmaterialien

96-Well-Mikrotiterplatte	Roche, KarlsruheBiosphere®
CELLSTAR® Cell Culture-Flasks (75 cm^2)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
CELLSTAR®-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Roth, Karlsruhe
CELLSTAR® 6 Well Zellkultur Multiwell Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filterspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Hybridisierungsröhrchen HB-OV-BM	FisherScientific, Schwerte
Multi SafeSeal® Tubes 0.5 ml, 1.5 ml	Roth, Karlsruhe
Nescofilm	Roth, Karlsruhe
Nylonmembran Hybond-N	Amersham Biosciences, München
Precellys-Keramik-Kügelchen (Ø 2.8 mm)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
0.5ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
1.50ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
TPP-Kryoröhrchen	Biochrom AG, Berlin
Whatman®-Blotpapier	Schleicher&Schuell, Dassel

Chemikalien und Medien

Für alle DNA- und cDNA- Analysen wurde Wasser verwendet, welches mit dem Milli-Q Integral Water Purification System doppelt destilliert wurde. Spezifische Parameter sind online (http://www.millipore.com/catalogue/module/c72876#0) verfügbar.

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem, Darmstadt
ABI Prism®-Verdünnungspuffer	Amersham Biosciences, München
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biodeal, Markkleeberg
Ammoniumpersulfat	IBI, Regensburg
Ampicillin	AppliGene, Illkirch Graffenstaden
Baktotrypton	Difco Laboratories
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CASO-Agarplatten	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Desoxynucleosidtriphosphate [10 mM, je dATP, dTTP, dGTP, dCTP]	Roche, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
Dulbecco‘s Phosphate Buffered Saline	Biochrom AG, Berlin
Essigsäure (100%)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (99.8%)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Fötales Bovines Serum	Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe

Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Serva, Heidelberg
Kasein-Pepton Sojamehl-Pepton Agar	SIFIN, Berlin
L-15 Leibovitz Medium	Biochrom AG. Berlin
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Percoll Dichtegradienten-Medium	Biochrom AG, Berlin
Roti®-Block	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	AppliChem, Darmstadt
ß-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Tris	AppliChem, Darmstadt
Trypsin	Biochrom AG, Berlin

Geräte

Array Scanner 428	Affimetrix, Santa Clara, USA
Block Heater Stuart SBH130D	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, USA
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
CO_2-Brutschrank	Memmert, Schwabach
DNA Thermal Cycler Perkin Elmer Cetus	Scientific Support, Inc, Hayward, USA
Elektrophorese-Kammer (Electro-4)	FisherScientific, Schwerte
Elektrophorese-Station, Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Feinwaage Delta Range® PM480	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
HERAsafe HS Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Homogenisator Precellys 24	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Hybridisierungsofen Shake ´n´ Stack	FisherScientific, Schwerte
LightCycler® 480 Real-Time PCR System	Roche, Mannheim
Long Read DNA Sequencing System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg v.d.Höhe
Medingen Wasserbad W6	Labortechnik Medingen, Dresden
MegaBACE™DNA Analysis System	Amersham Biosciences, München
Microfuge MicroV	FisherScientific, Schwerte
Milli-Q Integral Water Purification System	Millipore, Billerica, USA
NanoDrop™ 1000 (Mikrovolumen Spektralphotometer)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Potter Elvehjem Homogenisator	Landgraf Laborsysteme HLL, Langenhagen
Schüttelwasserbad für Hin-und Herbewegung	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Schüttler Unitwist 3-D	UniEquip, Planegg
Steril Bank HERAsafe	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge Allegra® X-12R Benchtop	Beckman Coulter, Krefeld

molekularbiologische Kits

DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences, München
DNeasy Blood & Tissue-Kit	Qiagen, Hilden
Genisphere Array 50™ Kit, version 2	Genisphere Inc., Hatfield, UK
GenomeWalker™ Universal Kit	Clontech, Heidelberg
Microcon Centrifugal Filter Device	Millipore, Billerica, USA
Super Script™II Kit	Invitrogen, Karlsruhe

ZR Plasmid Miniprep™-Classic Zymo Research, Freiburg

Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die *Primer* wurden für eine *Annealing*-Temperatur von 60°C generiert und in der gelieferten Konzentration von 100 pmol/µl eingesetzt. Für die qRT-PCR-Analysen wurden die *Primer* auf 50 pmol/µl verdünnt.

Tabelle 23 Primer für qRT-PCR-Reaktionen

Primername	Primersequenz
OM_EF-1a_f1	TGATCTACAAGTGCGGAGGCA
OM_EF-1a_r1	CAGCACCCAGGCATACTTGAA
OM_HMGT_LCF1	CTCTGAGAGATGGAAGACCATG
OM_HMGT_LCR1	CGCAGACGATGGTCTCTTGG
OM_HMGB1_LCF1	CGATGGAAGCCCATGTCTCCT
OM_HMGB1_LCR1	AGAAGATGAAGAACGCAGACGG
SS_MARCH3_LCF1	CTGATGGAGTGGGTGCGTAAC
SS_MARCH3_LCR1	GGCTGGAAAAGTGCAGGTGGT
SS_ST2L_LCF1	GATCTGAGGATGGGAAGGTCTA
SS_ST2L_LCR1	CTGCCGTGGATGAAGAGTCTAA
OM_IRAK3_LCf1	CCCTGCTGAGAAACGTCCTAC
OM_IRAK3_LCr1	GGGTCTGTTGCGTGGTCGTG
OM_ADIPO_LCF1	AGCCACCGTGGAGGAATTGA
OM_ADIPO_LCR1	GGCGCCTTAAAGATGCCAGT
OM_Adipo2_LCF2	AAAAAGCTGGTCTACAGAGAGGT
OM_Adipo2_LCR2	GACTTTGCCACCGTTCTTATACA
SS_CTRP3_LCF1	GGCCCCGTTGGACGCAAAGT
SS_CTRP3_LCR1	CAGCCCCAGGACAGGAGCAT
OM_TCBP1_tv1_LCF1	ATGCTTCCTCTCCAGCTGATTG
OM_TCBP1_tv1_LCR1	CAGAGTTGCATGACTTTCTCAAG
OM_TCBP1_tv2_LCF1	TTGACTTTATGGCGTTGCCATGT
OM_TCBP1_tv2_LCR1	GAGAAGGCCACATCTACAGAGT
OM_TCBP2_LCF2	ATCTTGACATGGGAGCCTTCAC
OM_TCBP2_LCR2	TCCCCACTCAAATACAGACCGT
OM_CLEC14A(CRL)_LCF1	GTATGGAGGAAGCCTCGAAGAT
OM_CLEC14A(CRL)_LCR1	GTGTCGCTGCTGTTATCCACC
ON_CD93_LCF1	GGAGAAGGAACCTCGCAGCA
ON_CD93_LCR1	GCTCTCCTCCTGCCAACAAC
OM_CD209_1_LCF1	ATCTCTCAGGTACCGGAAGAGT
OM_CD209_1_LCR1	TGCTCCTCTCTCCAGACAGTC
OM_CD209_2_LCF2	GATGGAAGAACAAGACTCTACAG
OM_CD209_2_LCR2	CCATCCTTCAATACACCCTAACA
OM_C1q_LCF1	TGGAGCCGTTTAAAGACGAGCA
OM_C1q_LCR1	TGGTTCCCAGGGACAGCTCAT
OM_C1s_LCF1	CGGGTGTACCCAGTTCTGCC
OM_C1s_LCR1	TATGGGCCGGGCCGAGAGG
OM_C1r/C1s_LCF1	TGAGTGTTCAGCTCCAGACCC
OM_C1r/C1s_LCR1	TGGACAGAGTCCCCTCTGGTT
OM_C2-B_LCF1	TGATCTCGCACCCACAGTACAA

OM_C2-B_LCR1	TCGGTTGGCAGGCTTGGTACA
OM_C4_LCF1	TTGTGCTGCCGAGCTTTGAG
OM_C4_LCF1	TTTCACCATCTGGCCCCTGT
OM_C3 (NEU)_LCF1	AGCCTCTGACCAGGGAGATATT
OM_C3 (NEU)_LCR1	GACGATGTCAGGGAGTTTGAAC
OM_C3-3_LCF1	AGATGTGTGCCGTTGTGCTGAA
OM_C3-3_LCR1	ATCGGTGTAGGACTCCAGTGTT
OM_C3-4_LCF1	CCTCCATGGTCAATGCAACACT
OM_C3-4_LCR1	CTTTCAGATCTAGTGCCTCTCTA
OMF_MASP2_LCF2	TTTGACGTAGAGGGCCACTCG
OMF_MASP2_LCR2	CCGACCTGAATGAGACATGTAC
OM_MASP3_LCF2	CTATGGCTACCTGCTGCATTCT
OM_MASP3_LCR2	ATCTTCCAGCTCAATGTGGTACA
OM_MBL_LCF2	CGTGCCCTGTGAGTGGAAGTT
OM_MBL_LCR2	TGTCATGTTGGTGAGCTGCAGT
OM_MBL2_LCF1	TAAAGAGGGGAAGTTTCAGGTAG
OM_MBL2_LCR1	TGAAGGAGCAATCATATGTCACC
OM_CFB_LCF3	GACACCGATCAGGAAGGAAAGA
OM_CFB_LCR3	GGGCTGACTGAAAAGGAGCTAA
OM_CFB2_LCF1	AAGGTAGATGGCATAACATCAGAT
OM_CFB2_LCR1	GGATTGTGCGATAATCATCATAGT
OM_CFD_LCf1	TAATGGCACCCTACCAGACAAG
OM_CFD_LCr1	ATCACCCGAGCAGAAGCCTTG
OM_C5_LCF1	GGCAAGGACTTTTTCTGCTGCT
OM_C5_LCR1	TTGGAGAAGCTGTAGGCTGTAAT
OM_C6_LCF1	CCCGTGTGCCAAAAAACAGTTAA
OM_C6_LCR1	CTGAAACTCTTTGCAGTTGAGTG
OM_C7-1_LCF1	ACAAGTCTCACAGGCTGCTGAT
OM_C7-1_LCR1	TAGTGGGTGCCATAGGTCTGTA
OM_C7-2_LCF1	GCCGCTCAGGGAAGTGTATCA
OM_C7-2_LCR1	AACCCCAGTCCTAGTTGCTCAA
OM_C8_LCF1	TACGGAACGCACTACGTCACC
OM_C8_LCR1	CTACCTGCTTCGTCTTGCCTAT
OM_C9_LCF1	GGACTGCAGGATACGGAATCAA
OM_C9_LCR1	CCTCTGCTATAGTCTCATAGTTG
OM_C3aR_LCF1	GGCTTATACTCGGCTTCCTCAT
OM_C3aR_LCR1	TAAGGCAGCCAACACACAAAGAA
OM_C5aR_LCF1	GGAATGTCTCTTTAAGCACTTGAA
OM_C5aR_LCR1	TGGTTCATTCATGACATTACTCCT
OM_CFP2spez_LCF1	GGACAGAGAGCTAGCAGTAAGA
OM_CFP2spez_LCR1	AGTAGCCAGAGATCGTCACAATT
OM_CFI_LCF1	ACCCAGTGTTTGCAAGAGAACC
OM_CFI_LCR1	CAGTTGGCGATCAGAGAGACG
OM_CFH_LCF1	GCTGGACCAAGACACTTGGC
OM_CFH_LCR1	CACCAACCCCCGGTAGAGG
OM_SERPIN1_LCF1	AAGGAATGACGAACGGCAAACG
OM_SERPIN1_LCR1	TCAGCTGTCTCACAGTAGTACAT
OM_CD59_LCF1	GATTGAGTGGGCAAAGTATTGTAT
OM_CD59_LCR1	AGCAATGTTATGTAACAGGGTATG
OM_CD59_2_LCF1	ACCGGGAACATTGTACATGCTAT
OM_CD59_2_LCR1	GGTGGGTGAATAGACTACTAGC

Tabelle 24 *Primer* für Sequenzaufklärung

Primername	Primersequenz
OM_IRAK3_F1R	CCCTGCTGAGAAACGTCCTAC
OM_IRAK3_F2R	CGACCACGCAACAGACCCAC
OM_IRAK3_F3	ACGCTGACAGGGTAAGGAAA
OM_IRAK3_F4	TGTTTTCGTCACCACGTCCTGT
OM_IRAK3_F5	CGCAGTTGAGATGGACTCGTC
OM_IRAK3_F6	TGCAGCCCAAGCTGTCTGATTT
OM_IRAK3_F7	GAGATGGACTCGTCTATGTACC
OM_IRAK3_R1	GTGGGTCTGTTGCGTGGTCG
OM_IRAK3_R2	GCCAGTGTCTTCCACCTCTC
OM_IRAK3_R3	ATCGTATGTATACCCCGGCA
OM_IRAK3_R4	ACAGGACGTGGTGACGAAAACA
OM_IRAK3_R5	CAGTTAGTACAGTGTAACTAAGGA
OM_IRAK3_R6	TAACCACTCCCAAGCTGAACAC
OM_IRAK3_R7	ACATTGGTTTCCTTACCCTGTCA
OM_IRAK3_R8	GTGGGGCTCTTGCCTATCGC
SS_ST2_F1	AGAAGAGAACACCCCCAGGT
SS_ST2_F2	TGTGGGGAATAGTAGGTGGC
OM_ST2L_F1_NEU	CTGCCGTGGATGAAGAGTCTAA
OM_ST2L_F2_NEU	AGTCATAGTCCTCCGCTGTGG
SS_ST2_F3	ACTTTCAGGTTGGTGGATGG
SS_ST2L_F4	AGGTAGCCTAGGACAACAAAAATA
OM_ST2L_F5	GATGTGGTCTATCTTGGTTTAGTT
OM_ST2L_F6	GGGGCTATTGCGTTGTAGCTAT
OM_ST2L_F7	AAAGTGCGCTCGCAGCAGCAA
SS_ST2_R1	GTAACGCACCCTCTTCCAGA
SS_ST2_R2	CCATCCACCAACCTGAAAGT
SS_ST2_R3	GAACTTGCAACGTACTTGTAAGAA
SS_ST2_R4	AACTAAACCAAGATAGACCACATC
SS_ST2L_R5	TTCAATGTTCTGCCCACAAAACG
SS_ST2L_R6	GCCACCTACTATTCCCCACA
OM_ST2L_R7	TTTCTGGTCGTTCATTGCAACAC
OM_ST2L_R8	ATTCAGGTCTGAGGACTTGACG
SS_MARCH3_F1	AGCGGCTGTCTTTCTTTGC
SS_MARCH3_F2	AAACATCCCATCTTTGACTCAT
OM_MARCH3_F1_NEU	TATGGGTCTCTGTGCCTCAAAC
OM_MARCH3_F2_NEU	GTTGAGAACTGGTTGACTGTGG
SS_MARCH3_F3	CCAGTCGCTGCACTCTGTTA
SS_MARCH3_F4	TGAAAAATGGCCTTCCAAAG
SS_MARCH3_F5	GAGTGTTAAACAGGGCGTAGGT
SS_MARCH3_R1	CTTTGGAAGGCCATTTTTCA
SS_MARCH3_R3	GTTACGCACCCACTCCATCAG
SS_MARCH3_R4	TAACAGAGTGCAGCGACTGG
SS_MARCH3_R5	GCAAAGAAAGACAGCCGCT
SS_MARCH3_R6	TTCCACTTCAAAAAGCTCAATGTG
SS_MARCH3_R7	ACCTACGCCCTGTTTAACACTC
OM_CD209_F1	GCTTGAATGTGATTGGTTCG

OM_CD209_F2	TTTGGATAAGAGCGTCTGCT
OM_CD209_F3	GAGAACAGAGCAACGAGGAGA
OM_CD209_R1	CGAACCAATCACATTCAAGC
OM_CD209_R3	TCCAGTGAGGAATTTCTGTTCA
OM_CD209_R4	TCTCCTCGTTGCTCTGTTCTC
OM_CD93_F1	CACCTGCATCCGAGATGTGAC
OM_CD93_F2	AAGGTTGAATTTGCAGAACGAGC
OM_CD93_F3	CGTTTGTACTTTGGCAGGGAATA
OM_CD93_F4	CAGGAGGGGAGCAAGTGATTTA
OM_CD93_R1	TAGTCCAGCCATAGACACCATC
OM_CD93_R2	GCTCGTTCTGCAAATTCAACCTT
OM_TCBP1_F1	GACACGGTTTCCCTGGTCCTA
OM_TCBP1_F2	GTGTGTGAGGCAATAAAAGCAATA
OM_TCBP1_F3	AAAGGCTCCACTTCTGTTACTTTT
OM_TCBP1_F4	ATTCCAAGGAAAACCGCCATAGA
OM_TCBP1_F5	ATTCCAAGGAAAACCGCCATAGA
OM_TCBP1_R1	GCCAGAGAAAAGGGTAATGAAAG
OM_TCBP1_R2	CAATCAGCTGGAGAGGAAGCAT
OM_TCBP1_R3	TCATCATTGTCTTCATCTGGACC
OM_TCBP1_R4	TCTATGGCGGTTTTCCTTGGAAT
OM_TCBP1_R5	CTTTCATTACCCTTTTCTCTGGC
OM_TCBP1_R6	AAAAGTAACAGAAGTGGAGCCTTT
OM_TCBP1_R7	TAGGACCAGGGAAACCGTGTC
OM_TCBP1_R8	TATTGCTTTTATTGCCTCACACAC
OM_TCBP1_Kons4_1	TTATGCCGTGACCCTTTCATTAC
OM_TCBP1_Kons4_2	ATGCCGTGACCCTTTCATTACC
OM_TCBP1_Kons5	GTGCTGTCTCCAGGCAGATGA
OM_TCBP2_F1NEU	ATCACAGACGTCAACATGTGGG
OM_TCBP2_F2	GTGTGATGTACATTATCTGAGGAA
OM_TCBP2_F3	ATAAAATGGGGCTGCTGGCAAC
OM_TCBP2_R2_NEU	GAGAGCATGTGTTGGGTGCC
OM_TCBP2_R3	GTAGTCCCACATGTTGACGTCT
OM_TCBP2_R4	CCATACCTAACTTCGAGTCCCA
OM_TCBP2_R5	ACTTCCTCAGATAATGTACATCAC
OM_TCBP2_R6	TCCTCAGATAATGTACATCACACT
OM_CFD_F1	GAATGTGCCCGCAGGTGGAC
OM_CFD_F2	CAACCCCAGTACCCCTGATGT
OM_CFD_F3	CGCCTTGAATGGCACTGATG
OM_CFD_F4	GCACTATGGCAATCTGCTCAGT
OM_CFD_R1	ATCAGGGGTACTGGGGTTG
OM_CFD_R2	GACAAGTCATGAGCCCCAAG
OM_CFD_R3	ACAATACCCACTTTCGGCAC
OM_CFD_R4	CATCAGTGCCATTCAAGGCG
OM_CFD_R5	CCTGGTCTAAATGAGATCAGTTAT

Tabelle 25 Primer für reversen *Northern Blot*

Primername	Primersequenz
OM_CLEC4M_SBF1	ACTACTCAGTCAGAAACGTGATC
OM_CLEC4M_SBF2	GTCAGAAACGTGATCATAAGTAAG
OM_ CLEC4M _SBF3	TACCGGAAGAGTGGTGGAAGAT
OM_ CLEC4M _R1	GAGAGTTACATGCTATGCCATTC
OM_TCBP1_F5	ATTCCAAGGAAAACCGCCATAGA
OM_TCBP1_F3	AAAGGCTCCACTTCTGTTACTTTT
OM_TCBP1_SBF1	TCCAAGGAAAACCGCCATAGATA
OM_TCBP1_SBF2	GTGACCCTTTCATTACCCTTTTC
OM_TCBP1_SBF3	AGCTGCCCTGCGACCTAGTAT
OM_TCBP1_SBF4	CGGACAGGAGCATTCACAGCA
OM_TCBP1_R8	TATTGCTTTTATTGCCTCACACAC

Hard-und Software

ABI PRISM™Systeme	Applied Biosystems, Darmstadt
Affymetrix® Jaguar™ Software Version 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Balanced Subcellular Localization Predictor (BaCelLO)	http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm
Biometric Research Branch (BRB-ArrayTools)	http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html
Datenbank NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Datenbank Genomic Research on Atlantic Salmon Project (GRASP)	http://web.uvic.ca/grasp/
The Database for Annotation. Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7	http://david.abcc.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp
GeneCards	http://www.genecards.org/
Generic Gene Ontology (GO) Term Mapper	http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermMapper
Genomatix-MatInspector	Genomatix Software GmbH
iHOP-Information Hyperlinked over Proteins	http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/
Ingenuity Pathway Analysis (IPA)	Ingenuity Systems. Inc
InterProScan Sequence Search	http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/
LightCycler® v3.5	Roche Diagnostics
Mann-Whitney U Test	http://elegans.som.vcu.edu/~leon/stats/utest.html
Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software v4.0	http://www.megasoftware.net/
Multiple Sequence Alignment program (ClustalW2)	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
Prediction of Transmembrane Regions and Orientation (TMpred)	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
ProtParam tool	http://web.expasy.org/protparam/
ScanProsite tool	http://prosite.expasy.org/scanprosite
Shapiro-Wilk Normality Test	http://dittami.gmxhome.de/shapiro/
Signal Peptide Prediction (SIG-Pred)	http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html
Transmembrane Prediction Server (Philius)	http://www.yeastrc.org/philius/pages/philius/runPhilius.jsp
VisionWorks™LS	Life Science Software UVP
Windows®XP (inclusive Excel, Word, PowerPoint)	Microsoft®
Umrechnungsprogramm von Gewicht in Mol	http://www.molbiol.ru/ger/scripts/01_07.html

B Different exprimierte Immungene in der Milz gesunder Forellen beider Stämme

Tabelle 26 Überblick über die mittels Microarray-Analyse identifizierten Immungene mit differenter Expression im Milzgewebe gesunder Regenbogenforellen der Stämme TCO und BORN.
(FC ≥ 1.5, p ≤ 0.0001). Die Gene sind nach absteigendem Expressionsunterschied (FC) sortiert.

Nr.	Accession	offizielles Gensymbol	offizieller Name	Microarray		qRT-PCR		Funktion
				FC	p-Wert	FC	p-Wert	
14	CB499677	***CD93***	CD93 molecule	-8.19	3.18E-20			• complement system
19	CA054974	***RAF1***	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	-7.32	2.55E-18			• IL 6/IL2 signaling pathway
24	CA051449	***CSNK2A1***	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	-6.48	3.96E-15			• IL 6/IL2 signaling pathway
39	CB509461	***APOE***	apolipoprotein E	-5.46	1.85E-64			• recruitment and activation of macrophages/ lymphocytes
59	CA044758	***RGS5***	regulator of G-protein signaling 5	-4.74	1.41E-15			• G protein signalling
60	CA058096	***ABCC5***	ATP-binding cassette, sub-family C, member 5	-4.73	3.17E-27			• antibacterial response
62	CB511729	***CD99***	CD99 molecule	-4.72	1.08E-21			• leukocyte migration, T-cell adhesion
65	CB512670	***JUN***	jun proto-oncogene	-4.68	4.10E-14			• IL 6/IL2 signaling pathway
73	CB492604	***GSTA4***	glutathione S-transferase alpha 4	-4.46	1.81E-12			• LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function
95	CA038317	***C1QTNF3***	C1q and tumor necrosis factor related protein 3	-4.08	3.02E-10	-22.56	0.02	• suggested activator of complement cascade in fish
96	CA055450	***FCER1G***	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for gamma polypeptide	-4.06	3.36E-11			• CD28 signaling in T helper cells
111	CA057824	***APOE***	apolipoprotein E	-3.95	2.37E-14			• recruitment and activation of macrophages/ lymphocytes
101	CA055124	***CD97***	CD97 molecule	-3.85	1.72E-09			• leukocyte migration
121	CA044359	***CYP1A1***	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	-3.71	6.96E-11			• antibacterial response
136	CB509860	***C5AR1***	complement component 5a receptor 1	-3.57	1.22E-11			• complement system
141	CA052546	***CFD***	complement factor D	-3.54	1.35E-07	-18.88	1.00E-06	• complement system
146	CA060737	***GRB2***	growth factor receptor-bound protein 2	-3.51	1.18E-10			• IL 6/IL2 signaling pathway
179	CA037647	***ALB***	albumin	-3.26	1.08E-08			• acute phase response signaling
198	CB492713	***MHCIb***	MHC class I b region	-3.2	8.60E-15			• antigen presentation
196	CB511801	***CLEC4M***	C-type lectin domain family 4, member M	-3.19	6.70E-08	-	-	• pathogen recognition receptor
		CLEC4M _tv1	*transcript variant 1 (complete ORF)*			-2.1	0.005	
		CLEC4M _tv2	*transcript variant 2 (exon2 removed))*			-1.71	0.029	
207	CA060746	***HMOX1***	heme oxygenase 1	-3.14	3.79E-12			• acute phase response signaling
215	CB508292	***FTL***	ferritin, middle subunit	-3.09	4.35E-07			• acute phase response signaling
224	CK990226	***ITLN2***	intelectin 2	-3.04	4.27E-11			• carbohydrate binding
234	CA057818	***CD4***	CD4 molecule	-2.99	4.33E-23			• MHC class-II antigen/T-cell receptor interaction
257	CB496898	***BANF1***	barrier to autointegration factor 1	-2.90	1.79E-05			• antiviral response of organism
260	CB502881	***LGALS2***	lectin, galactoside-binding, soluble, 2	-2.89	2.18E-10			• carbohydrate binding
268	CA060009	***PPP2R2A***	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha	-2.86	1.77E-16			• CTLA4 signaling
276	CA056142	***CLEC14A***	C-type lectin domain family 14, member A	-2.83	4.52E-22			• carbohydrate binding
277	CA062153	***MGST1***	microsomal glutathione S-transferase 1	-2.83	8.68E-05			• antibacterial response
353	CA057032	***HMGB1***	high-mobility group box 1	-2.58	1.71E-06	-1.12	0.4	• activation of macrophages
362	CA051810	***HMGT1***	high-mobility group box 1	-2.55	8.00E-07			
365	CA037886	***C4***	complement component 4	-2.54	8.56E-13	-3.31	2.00E-04	• complement system
385	CK990666	***LGALS8***	Lectin precursor	-2.48	0.002269			• inflammatory response of endothelial cells
403	CK990258	***MHCI***	MHC class I antigen	-2.41	7.35E-05			• antigen presentation

Nr.	Accession	offizielles Gensymbol	offizieller Name	Microarray		qRT-PCR		Funktion
				FC	p-Wert	FC	p-Wert	
417	CB494129	***COL1A1***	collagen, typeI, alpha1	-2.37	1.87E-07			• response to organic substance
464	CB497161	***CD9***	CD9 molecule	-2.25	6.74E-07			• fusion of alveolar macrophages
467	CA054557	***MARCH3***	membrane associated ring finger 3	-2.24	1.70E-19	-1.44	5.00E-06	• suggested ubiquitination of immune receptors
483	CB516701	***IL1RL1***	interleukin 1 receptor-like 1	-2.22	1.18E-15			• TLR signaling
513	CA042016	***NRAMP2***	Natural resistance-associated macrophage protein 2	-2.15	9.64E-05			• involved in host resistance to certain pathogens
515	CB517506	***IL13RA2***	interleukin 13 receptor, alpha2	-2.14	4.41E-08			• IL13 signalling
523	CB505764	***C1QL4***	complement component 1q subcomponent-like 4	-2.12	2.26E-08	-6.97	5.00E-03	• complement system
526	CB518089	***NPPC***	natriuretic peptide C	-2.10	0.008772			• response to organic substance
529	CB492648	***APOB***	apolipoprotein B	-2.09	3.02E-08			• recruitment of macrophages
531	CB487219	***A2M***	alpha 2-macroglobulin 4	-2.09	1.31E-10			• acute phase response signaling
532	CB500771	***APOE***	apolipoprotein E	-2.08	4.94E-06			• recruitment and activation of macrophages/ lymphocytes
649	CA044387	***MHCI***	MHC class I (UBA)	-1.77	1.31E-11			• antigen presentation
661	CA060728	***MX2***	myxovirus (influenzavirus) resistance 2	-1.74	0.003633			• antiviral response of organism
691	CB514298	***CAPG***	capping protein (actinfilament), gelsolin-like	-1.68	1.52E-09			• role in macrophage function
707	CB513665	***IGLL1***	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	-1.66	2.52E-15			• part of pre-B-cell receptor complex
711	CA041609	***RGS5***	regulator of G-protein signaling 5	-1.65	0.003748			• G protein signaling
715	CB497328	***CD3E***	Salmo salar CD3epsilon gene, complete cds	-1.64	5.25E-07			• part of the T-cell receptor-CD3 complex
727	CA050149	***IRG1***	immuno responsive 1	-1.62	6.19E-08			• response to organic substance
750	CA055841	***IRAK3***	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	-1.59	1.21E-14	-1.39	0.001	• TLR signaling
786	CB498566	***COL10A1***	collagen, typeX, alpha 1	-1.52	1.68E-09			• response to organic substance
788	CA044976	***HBXIP***	hepatitis B virus x interacting protein	-1.51	6.89E-13			• antiviral response of organism
791	CA063170	***CD9***	CD9 molecule	-1.49	1.66E-07			• fusion of alveolar macrophages

C Auflistung der annotierten Sequenzen

ST2L

>gi|452084734|emb|HF678447.1| Oncorhynchus mykiss mRNA for interleukin 1 receptor-like 1 (ST2L) (IL1RL1 gene)

TTTTAGCCAGGAAGCCTAGGACAACAAAAATGTAAAGCGTGTACTGTATGACAAAATGATAAACGCTAAT
GACAAAACGTTTTTTTTTTTCTACAAGTACGTTGCAAGTTCCTGTTTTACAGAAA**ATG**CGCTCCTTCACA
TTCAGGTTGGTGGATGGTGGTCTCATGTTCCTGCTCCTCAGTTTGACTAGGATTTCTGCCCAGAGAGAAA
TGTCCTTAAACCCCACTACAATAAGTCATTACACAGAGTCCCCATGTCAACTATTTGACAAGTATGAAAC
TACTGTGACAGAGGGGGAGGCCCTTAGTTTGCCAGCCTACTATGACCTGAGTGAGTTGGTTTGGGCCAGC
GTGACTGAGTTTACCTGGTACAGAAACAGAACCCAAGAGCTCTCGTCCTCTGAGGAAGAGCGTGTGCATC
ATCATGGACCGGTGCTCTTCTTCCTCCCCCTTTTAATCAACGACTCTGATCAGTACTACACCTACTGGAG
AAAGGGAGCAGACACCTGCCTCATTTTTGTGACAGAGGTGATTGTGGTCAAAGCCCAACCGTTCGATCAT
TCAGTCTTGTTTAACGATATCTCAGAGTCAGCAGAAAACATCGCTATCCCATGTCCTGACCCTGTGGAAA
AACTATGCCAAGATGGAAAAGATAACTTAGCCTGGTATAAGAATTTCAGTCTCATTCCAAACGAGTCTGA
GAGAAATCTGTGGGTGTATGGCGCCTCCAAAGCAGACGAGGGCATCTATACGTGTGTGTGCACGTGGGAG
CACAATGGGACGGTTCTCAACACTTCTGCATCCAGGAGACTAAAGATCCAAGCTCCCTCTGCCTCGCATC
CTCCTCAGATCAACCTGCCTATAAACGGAAGCACAGAGACCACTGACCTGTACACCACTAAGAAGTTGAG
GTGTGAAGCGTTTTGTGGGCAGAACATTGAAGACAACTGTCACGTGTGGTGGGAGATAAATGGAGTGAAA
GTGCGCTCGCAGCAGCAAGGCTACTCGGTGAACACCACCAGTGAGGTGGAGGTATCTTCAATGCGGAGTA
TCTTCACAGCTATCCTGACCATAAACACAGTGACTATGAGGGACCTCCAGTCAAAGTTCACATGTGTTGC
AATGAACGACCAGAAATGGAATTATGCAGTGGTTACTCTCAAGCTAAGAGGGTTTATGGGTCTATGTGTG
GTGCTACTGCTCTTCTTCTTGCTAGCTGCTGTGGCTGTCAAAGTATTTGACATCGATCTGGCGCTCCTCT
TCCGTGGAGTTTTCAAATGCTGTGGTCGATCTGAGGATGGGAAGGTCTATGATGCTTACGTTGTCTACCA
GATGGATGGCTTAGATCAGGAAAGGGAGGAGAAAGTGTATCACTTTGTGAGCATTGTTCTGCCCACTGTC
CTGGAGCAGAAGTGTGGCTTTAGACTCTTCATCCACGGCAGAGACGACTTACCTGGGGAAGACAACATGG
AGTTGGTGGAGGCCTGCATGCGACTGAGCAGGAGGCTGATTGTCATCCTGACCCCCAGCTCAAGCACACG
GTCAGGCTCAGGAGGTCAAGGGTCATGTGGCCAATGGGGCTACTCGTCTTCGTTGACCACAGCGGAGGAC
TATGACTGTCAGGTGGGGCTCCTCCAGGCTCTGGTCCACAGTGAGATGAACGTTATCCTCATCCAGCTGG
GGGACATGGGGGAGGGTGGCTACACACACCTGCCCCCCGGCCTGCAGCACCTGGTCCGCAAGAGTGCCCC
CTTAATGTGGCATGAGGGAAGGCGTGGGTCGACGCTGCCCAACTCAAGCTTCTGGAAGAGGGTGCGTTAC
ATGATGCCTTGGCCGCGCTCAACTAGTTTTGACAACCAGTTAATA**TGA**CTGTTCTATGTGAACATTCAGG
TCTGAGGACTTGACGTGCGTGTGGAGGTCTGGGTTCTCTGAAAATCCTTATTCCATTCATAGAAATATCA
TTAATTATTCCAGTGCTGTGCAGAGATATACACAGGTTAGCTGAGAACGTCACAAAAACGATGTGTACAA
TGTGGCAGAAGGCCGTGTGTTTTTGTGATTCTGGATGGCTAGCAACAATGACAAGAAACTGCCATGTGGG
GAATAGTAAGTGGCTAATTTCAGCTAGTTTTATCTTGTTCTTGATTCCATGTCTTGTTTTTAGGTATTTT
GACTGATGTCATTTTTATGCTAATGGCAAAATGTGCTTGCTTACTAACCAACAACTGTAACAATGTATTT
CTGAGAGAACAAGTGTTCATTGTGTAACTTTTTTATGTTTTCAATAAACATTGGAGACTAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

IRAK3

>gi|452084736|emb|HF678448.1| Oncorhynchus mykiss mRNA for interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3 gene)

ATGGACTCGTCTATGTACCTGTATGATGTCCCCCCAGTTTTGATGGAGAAGTTTTGTAAGATAATCGACA
GCGGTGATGACAGCCTCGGATGGCGCGGGCTCGCGGCGCGTATCGTGCCAAGTTGGACGGAGGTGCGACG
CACCGAGAGGCTGGAGGCGATAGGCAAGAGCCCCACGCGAGAACTCATCTGGGCGTGGGCGCAACAGAAC
AAAACTGTTGGGGACCTTGTGAAGGTGTTGGAGGATATGTGTCACTACAGAGCTCTGCAGCTCTTTAGTC
CTCAAGTGTGTGTTTTCGTCACCACGTCCTGTTTTCTCAGTCACCCCCCACCTGCCTGCGAGTCGACCCT
ACCTGGTTGGAACCAGTCTAATTATCACGTGTCAAGTGAAGGTAGAAACCACAGGCTTGTGATCACCTAC
TCAGACGTCATAGAGGGAACTAGACATTTTCACCAGGACATGAAGATCTCTGAGGGCAGCTTCTCTGCTG
TCTACAGAGTGGTGAAGGGAAATGAAACCTTCGCTGTCAAGCTCTTCAAGCAGGTGCAGAAAGCCTCATG
GAGGAAGTTGTGGGATCTATTCAGGAGAGAGATGGAAGTTCATCATCTCTACCAGCATCCTAACATCTTA
GAGCTGTTGGGTTGTTACTCTGATGGGGATCGTTACTGGCTGGTATACCCTTACCTTCCCAACGGATCTC
TGTTCCACAGACTGCATGACCAGAACGCAGTGCCTCCTCTCTCATGGCAGGAGCGCCTGGACATCATCAA
GGGGACGGCTAAGGCTGTACATCACCTACACATGGCCCAGCCCTGCACTGTGGTCTGTGGTAACATCACA

AGTTCTAACATCCTGCTGGACGAGCGGCTGCAGCCCAAGCTGTCTGATTTTGGGACGGCCCGTCTCAGAC
CCCACTCCGTCAGTCAGAGCTGCACCGTTACCTTGGATACGACCTTCGGAACCCTGGGCTACCTGCCGGA
GGAATACATACGAGACGGAAAGCTGTCCGTCAGTCTGGACGTGTTCAGCTTGGGAGTGGTTATAATGGAA
ATTATAACGGGACGGAAAGCTAGAGAGGAGACTCCTAAACACACCCTGCTGAGAAACGTCCTACGTGGAG
AGGTGGAGGACACTGGCAGTGTAGACTCCTGTCTTCAGTATCTGGACCCGAGAGCTGGTCTTTGTCCCCA
CTCTATGTCCTTTACCTTGTTGCGTCTAGCCCTGGACTGCACCTCTACACGACCACGCAACAGACCCACC
ATGGAGAATGTGTTACAGGTATTGAGCCAGCTGCTTCCCCTGCCGTGCCCACCTGAAGACCAGCCCCACA
CGCTGACAGGG**TAA**

MARCH3

>gi|392306966|ref|NM_001246354.2| Oncorhynchus mykiss E3 ubiquitin ligase MARCH3 (march3), mRNA

GATTTACCAGCTGACCGGGGTGGAAGTTGGCGTGGATCACTGACATTAAACCAAACGATTATTTGATCAT
CCTGCGTCGCAGTGTGTATAATCATAATTTGAAGATTTGGGATCTCACAATGAAGACAGATGATGCTCAG
TAACCAAGCCAGACGCCAAGAAAGATAACCGTCTGCTGCC**ATG**ACGACCAGTCGCTGCACTCTGTTACCG
GAGGTGCTGCCAGAGCGTTCTGACTCTGCCCACACAGGGAGTTGCTTGAGCGACAGGGACTTTGATCCAA
TGGGTAGCCTGGACTACCCGACAGAGCCTGACCTCCCAGGAAAAGCAATGGAAGAGCAGAACAGTCCGGC
CAATGGAGAGCCGCAGTACTACATGCAAGTGTCTGCCAAGGATGGGCAGCTGCTGTCACCTATCGTGGGA
GCGTACGCCAAACAGAGCCCTCTGCCTGAGCGGCCCATGTGTCGGATCTGTCATGACGGAGGGGGTCAGG
AGGAGCTGCTCTCCCCCTGTGAGTGTGCAGGGACCCTGGGTACCATCCACCGGAGCTGCCTGGAGCACTG
GCTCTCTGCCTCTGGCACCAGCGCCTGTGAGCTCTGCCACTACCAGTTCACTGTACAGAGGAAGAACCGG
CCACTGATGGAGTGGGTGCGTAACCCGGGCCTGCGCCAGGAAAAACGGACGCTGTTCGGCGACATGGTGT
GCTTCCTGCTCATCACGCCTCTGGCCACAATCTCCGGGTGGCTGTGTCTGCGGGGGGCCGTGGACCACCT
GCACTTTTCCAGCCGCCTGGAGGCCGTGGGCCTCATCGCCCTCACCGTGGCCCTCTTCACCATCTACCTC
TTCTGGACCCTGGTGTCGCTCAGGTATCACTGTCGGCTGTACAACGAATGGCGGCAGACCAATCAGAGGG
TGGTGCTTCTCCTCCCCAGGTCACATGGTGAGCCGTCTGCTCCGCCCTCTTCACGAGGCCCATCTCGTGA
AAAATGGCCTTCCAAAGAGACTATTGTC**TGA**GCAGCCCTTTCTTCAAAAGCCATGAAGTAAAAACACTGA
GGAAGAATGGGGATAGTTCCATAGGCGCCAGAACAGTATTTGCTTCTGGTGCCCTCCAGTGCTGAACTTT
GAATTGCCCACACGAGTGTGGAATTGCCACCAAATGTCATTAATGGGCACCTAGGAATGGTTTAAACACA
CATTTACTAAGGCGGTAGAGTTACTATACAACAGAGACCTTCTCTTCGGGGAAGCATCCATTTTGGACTC
AAAATGCAGCATTACATCCCACCACTGCCACCAATATGTCATACAGGGATGGACATTTGGTGATATAGAA
GTGGTGGAGTGCGTAGTTGGTCATGAAGCATTTGGACTAAAGGACAGCCAGGAAAAGTTTGCCACTGTGA
CCATATGCTGTGATTGGTGATTCCTGTGAAGTGCAGAAAACATTGTCTGGTTCATATAACATACCAACAT
AAACTTGTGTATAGTATTACTATATTAGTCACATTCTACCAATCAACAAGTCAAAGCCCAGAGTGTAAAT
AAGTACTTCAACTACTTCAGTATTTTACATAGTATTAAACTCTTACCTTTACATGTATGGGTCTCTGTGC
CTCAAACCAAGGTCATGTTCATTATGCACCAGAGAACTTACTGAAACAGTGGGGGACTACACTCATTTTT
CATTCTGTTTCAAAAGTATTTAAAACGTTTCACTACGGTGTGCCCTGCTGAACACGATCCAACTTAAGAC
AGGCTTT

TCBP1

>gi|400131696|emb|HE974763.1| Oncorhynchus mykiss mRNA for trout C-polysaccharide binding protein 1 (TCBP1 gene), isoform 1

GTTTTTTTCCACAGAAAGGCTCCACTTCTGTTACTTTTGTAATAAAGTCTAATTGAATTTACAAGCTCCG
GTGTCAAAGAAGAATGTGATTTAATATTTTCCACAACAGAAGTAGCTTTTTAGACAAATCCTCCATTCCA
AGGAAAACCGCCATAGATAAAGAAATATTTGACTTT**ATG**GCGTTGCCATGTCAGACCCTTTGCCTTCATC
ACCTGCCCTGTGCTGTCTCCAGACTCTTGCAGGTCCAGATGAAGACAATGATGAAGAAGACGAAGAAGAC
GATGCTTCCTCTCCAGCTGATTGTGATCATTTGTCTGTCTTATGGACAGGCAGATGATTCCACCAACAAG
CAATCCATCTCTGATTACAGCCGTGACCCTTTCATTACCCTTTTCTCTGGCCTGTCTGCCGAGGTGGGGA
ACCTGAGGAGGGAGGTTGAGGACTTGAGAAAGTCATGCAACTCTGTAGATGTGGCCTTCTCAGCTGCCCT
GCGACCTAGTATCCAGGACAATGAGGGCTACGGCAACACCGGGCCCTTCCAGGCAGACACCAACCTGGTC
CACAGTCACATCATCACCAACGTTGGCAACGCGTTCAGCCCCCGGACAGGAGCATTCACAGCACCAGTAC
ATGGAGTCTACTACTTCACTTTCACCTCCTATGCCTGGAAAAAGGAGGCCAACATCGGTGTGGCCCTTTA
CAAGAACCAAGAGCAGGTAGCTCTGGTCTATGAGTTTCAGGACAAGGGGGACAATGAAGACTTTGCGTCC
AACGGGGCCACCCTGCAGCTGGCCAAAGGAGACATCGTTTACCTGGTCCTACCGTCTAGTTTCCAGGTGA
CCAGTAATGCTTTCAAAAACCTTAGCACCTTCAGTGGCTTCCTTCTCTTCCAGGTTGAAGGAGAAAACGT

C**TGA**GAGACTGAGGGGGTCAGGGTGTAGGTTGGGAGGGTTCTCCACTTAACTTCCACACATTATAATCTC
TTTTGCTGTCATTTACATGTGTGTGAGGCAATAAAAGCAATATTAAAAACAGCAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAA

TCBP2

>gi|432177700|emb|HF546064.1| Oncorhynchus mykiss mRNA for trout C-polysaccharide binding protein 2 (TCBP2 gene)

ATAAA**ATG**GGGCTGCTGGCAACTCTTCTCATCTTTGGTGTCTCTCTCTCCTTAGCTTCTGCAGAGAGGCC
CATGAGAAGATCCTTGGTGTTCCCAATGGAAACTGACAACAGCTACGTGGAGCTGGTCCCTCAGAAGGAT
CTTGACATGGGAGCCTTCACCCTGTGCATGCGGGTGGCCACAGAATTGGCAGAGGGCAATCGTGAGATCA
TCTTGTTCGCCTACCGTACACTGTACCACGACGAGCTCAACGTGTGGAGAGAAGCTGACGGCAGGTACGG
TCTGTATTTGAGTGGGGACGGGGTCCTCTTCCACCTACCTGAGCTCAACACCTTCCAGACCCACCTCTGT
CTCACCTGGGACTCGAAGTTAGGTATGGCTGCGTTCCACGTAGATGGGAAGAGGAGCATTAGGAAGGTGT
ATAAACCAGGACACAAAGTGCAGAAGGGAGG**TAA**GGTCATCCTGGGACAGGATCCAGACTCTTTCCTGAA
GGACTTTGACAGCAAGCAGAGTTTCATCGGAGAGATCACAGACGTCAACATGTGGGACTACGTGCTCTCC
GATGCCATGATAGAGGCTTTGCATGTTGGGAAACGTATGCCCAGAGGGAACATTTTTGACTGGGAAACCA
TAGAGCTCATAGTCAATGGGAACGTCAAGGTGATCACTGAAGAGTTGTAAGGTGTCCCCAAGGCACCAAC
AACATGCTCTCCATCCAGGGGTGCTGCACTGCGGCCTGACCCTGTGCTCTCTCAACTGTGTGTCAGTGTG
ATGTACATTATCTGAGGAAGT

CLEC4M (HF559225)

CAACTATTCAACTACTACTCAGTCAGAAACGTGATCATAAGTAAGTTAATACTGTCAGCAAAAGTAAATTAGAATCAT
AGATATTACAATAAGGAGGTCAGACAGACAGACTGCAGTTAGTTAAG**ATG**GTCGACTATGTCAATAAACAGGCTATTG
AATTAAACAAGGTTATTGAAGGAAACGAGAACAGAGCAACGAGGAGAGTAAAGACTGAGACCCATCTCTCAGATGGAA
GAACAAGACTCTACAGGCTGGCTGCTGTGTGTTTTGGGATGATGTGTATTCTACAAGTCATTCTCAACATCTCCCTAA
AGCTAGCTTTCTGTACCGGAAGAGTGGTGGAAGATAGGGACATGGGGGTCCCAACAAGGACTCTGTTAGGGTGTATTG
AAGGATGGAGGCTGTCGGGATCCAGCTGTTACTTCCTGTCTACTGAGAAGAAAACCTGGGAGGAGAGCAGACAAGACT
GTCTGGAGAGAGGAGCAGACCTGGTGGTTGTAAACAGCAGAAATGAACAGAAATTCCTCACTGGATTAAGCAGGAATA
TTGATAGTGTTTGGATCGGTCTGACTGATAGAGAGACAGAGGGGACCTGGAAATGGGTGGATGGTACACCACTGGCCA
CAAGGTACTGGGGGCGTAACCAGCCTGATAATGGTGCCGTTTTTGTAGTACACATAGGAGAGGAGGACTGTGTTGAGA
TTAATTATGGGTATTCTGACCCTGTAAATAAATGGAATGACATAGCATGTAACTCTCAATTTAACTGGATTTGTGAAA
GGGTGATA**TAA**

CLEC4M-1 (HF559226)

CAACTATTCAACTACTACTCAGTCAGAAACGTGATCATAAGTAAGTTAATACTGTCAGCAAAAGTAAATTAGAATCAT
AGATATTACAATAAGGAGGTCAGACAGACAGACTGCAGTTAGTTAAG**ATG**GTCGACTATGTCAATAAACAGGCTATTG
AATTAAACAAGGTTATTGAAGGAAACGAGAACAGAGCAACGAGGAGAGTAAAGACTGAGACCCATCTCTCAGGTACCG
GAAGAGTGGTGGAAGATAGGGACATGGGGGTCCCAACAAGGACTCTGTTAGGGTGTATTGAAGGATGGAGGCTGTCGG
GATCCAGCTGTTACTTCCTGTCTACTGAGAAGAAAACCTGGGAGGAGAGCAGACAAGACTGTCTGGAGAGAGGAGCAG
ACCTGGTGGTTGTAAACAGCAGAAATGAACAGAAATTCCTCACTGGATTAAGCAGGAATATTGATAGTGTTTGGATCG
GTCTGACTGATAGAGAGACAGAGGGGACCTGGAAATGGGTGGATGGTACACCACTGGCCACAAGGTACTGGGGGCGTA
ACCAGCCTGATAATGGTGCCGTTTTTGTAGTACACATAGGAGAGGAGGACTGTGTTGAGATTAATTATGGGTATTCTG
ACCCTGTAAATAAATGGAATGACATAGCATGTAACTCTCAATTTAACTGGATTTGTGAAAGGGTGATA**TAA**

CD93

>gi|395627603|emb|HE963050.1| Oncorhynchus mykiss mRNA for complement component C1q receptor-like protein (CD93 gene)

CGTTTGTACTTTGGCAGGGAATAGAGAGCCTCATTTGTCATCCGTTTGCCAATTAAGGCATAAATGTAGC
ATATACAATATTCAAATCAATGGTTGTTGTTGGATTATGTGGGA**ATG**ATGCTTTTGCTAATTTTACTGCA
AATCTCTGTCTGGGGAGCCACTGGAGCAGACACTGGCGGAGAAGAAACCGTGTGCACATCCAATGCCTGT
TTCACTTTTCATATAGAGGGAGTCAGCTTCGACGACGCTCGTATGAAATGTGTAGATAACGGGGGTTACT
TGGTAACAACTAAAGACAAAGCTGAGGAAGCAGAGCTTCAATCAATCCTTACACAGATCGACGTAAGGAA

TCGCAATTTGGACTACAAATGTTGGATCGGACTGCAATTACATAAGGGGGACTGCATTATAACGGGCTTG
AGTCTCAGAGGTTTTAAGTGGATATCTGGAAGTGAAACTTCCCAATATTCCAACTGGGAGAAGGAACCTC
GCAGCACCTGCACAGAAGAGCGTTGCGTATTGGTATACTATTCTTTATCCGGTCGCAATGATTTAAAATG
GACGGATGGATCTTGCAAAGAAAAGGCTTTTTACGCTTGCAAATTCTACTTCAAGGGAATGTGTAAACCT
TTGTTGTTGGCAGGAGGGGAGCAAGTGATTTACAAGCTCCCATTCTCAGCAAATCCATTAAATGAGGATA
ATAACTTGACCGCGTTTCCATTTGGAACATATGCTGAAATAAGATGTAATGGCAATGACCACTTTTCTAT
TTGTAAGTTAACGGATGGTGTCTATGGCTGGACTATCCCCGGTCCGTTTTGCGCCACGGATAAACAGAGT
TGTGGCTATAAAAACGGTGGATGTGATCATGTGTGCTTTGATAGTGACGCCGGTGGTATTCGTTGTGGAT
GCAAGGACGGTTATGTGTTAGGACAGGACAGAGTATCTTGTGACTTAAAGGAATATTGTCACAGTTCTCC
ATGTCAATACCAATGCGTAACAGGACCAACGGGGTTCTCCTGCGTATGCCCAAGCGGCTTCCAATTGGAT
AAAGACCAATTTGGTTGTATCGATGTCGATGAATGCCAAATGAATGCCTGCGACGGTAATCATTGCGTCA
ATACCCAAGGTAGTTACACTTGTAAGTGCAATAAAGGCTACAGAATGGTTGAGGGCAAATGCCACGATAT
AGACGAATGCACTGAAACTAGATGTCCACAAATATGTCTTAACTCTGAAGGATCCTTCTCCTGCCATTGC
ATCGCAGGGTTCACTGTGTCCGAGGACGGTCATACTTGTATAGATATAGACGAATGCCTCAGTAATCGAT
GCGAGGACAAATGCACTAATACCATTGGTAGTTTCATGTGTTCTTGCCATCAGCACTTCCGGTTACACCC
TAATGGAATCACCTGCATTCGAGATGTGACTGTTGTTTCCACTGTTGAAACGTCAAATGTTTATAGAGAC
AACGACCAACACGACGAGACCATTGACACTATAACCATATCTAAGGTTGAATTTGCAGAACGAGCCTCAG
TTTACCGACGGACCACCTCAAGGCACTATTACGCAGGACATTACGCGCGAGGAGCCATCCAGCAAAACCA
CTGGAACGAGTTGGTTTACGCA**TAA**TGGCTCTTTTTTGAGCTCGTGGCTGTTTATTGGCATTATTGCTTC
TCTTGTTCCACTACTTCTTCTAATTGCAGTAACCTCTGGTATTGTCATGTTTCGATGTAGTCGTTCAAAA
AGAGAAGCGAGGAAGAAAATCGCCACTGCTGACAGTTACTGTTGGGTGGCTTCTGGTATAGAGACTCAGT
TAGAAAAATTTGACGGGTCACTTGAAAGCACGGCGTGAAATAGTGTCAACTCGGGAATGTAAAAACAATA
TTATTCTGACATTGCATTATTTACGAATATATAAATAAAACGTGTTCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAA

CFD

>gi|350537414|ref|NM_001246346.1| Oncorhynchus mykiss complement factor D (adipsin) (cfd), mRNA

ATTTTGCCCATTTGCACT**ATG**GCAATCTGCTCAGTGGTTCTTCACGTAGTTATTCTGCTCATCGCCTTGA
ATGGCACTGATGGGCGCAAGGTGCCGAAAGTGGGTATTGTTGGTGGCAGAGAGGCTGCTCGCAACTCTCG
TCCCTACATGGCTTCCCTTCAGTCTCGTGGTCAACACATCTGTGGAGGAGTTCTGGTCAGAGAGGATTTT
GTCCTCACCGCTGCACACTGTGACGGGCGATACAAGGTGGTTCTTGGGGCTCATGACTTGTCAGAGGATG
AAAATTCACAACAAGTATTGGATGTGGTTCGATCCATTCCACATCCGAGGTATGGGGACAACCTGGAGAA
TGACATCATGCTTCTCAAGTTGAGAGGGAGGGCCACCCTCAACACAGCAGTACAGTTGATCCCTCTGATG
AATGGCTCTATGGCTGAGGGAAGCATGTGCACCACGGCAGGCTGGGGGGATATAGGCGATAATGGCACCC
TACCAGACAAGTTGCAGGAGGTCAACGCCACCATCGTCCCTCCCAGAGAATGTGCCCGCAGGTGGACAGC
TGTCGAAATCTCCAGCCGCATGGTGTGCGCAACAGGCCCCAGAGCTTTCCAAGGCTTCTGCTCGGGTGAT
TCAGGAGGTCCATTGGTGTGTAACGGGATGTCAGCGGGCATTGTCTCTTTCTCAGGGCAGAGGTGTGCCA
ACCCCAGTACCCCTGATGTGTACACACGAGTGGCTTCCTACCGCCGATGGATTCAGACAGTGTTAGCTAG
AAACCCT**TAA**AGGGAACATTGTTTTCATTAGTCCACTGTTGATACAGTCACAAAATGTTTTATCAAGCAA
TCAAGTTTTCAAGATATTGGACTCGCAAGAAGCAAAGTGTCACCAGCCCCAATATTTGGTGTTTTATCAG
AAGTGAAGTTTTCAAGATATTGGACTCGCAAGAAGCAAAGTGTCACCAGCCCCAATATTTGGTGGATTTT
GCCTTTAAGGTTTTGGGCATGTAAGCTGTCAGTGTGTGTTTACACAATCTCACAATATAACTGATCTCAT
TTAGACCAGGTTTGCACAAGGTGTTTAATGATCAATAGTTCCCTTGTTGCTGTTCTTATTAAAATTGGTT
AACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

D Reverser *Northern Blot* von *TCBP1* in Milz, Kiemen und Leber

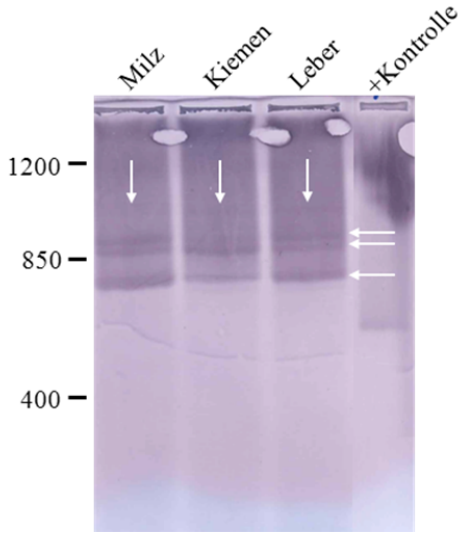

Abbildung 50 Reverser *Northern Blot* des Gens *TCBP1* zum Nachweis von Transkriptvariantenin Milz, Kiemen und Leber gesunder Regenbogenforellen (linienunabhängig).

E Ergänzung der Messwerte des Ergebnisteils 4.5

Tabelle 27 Expressionsunterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion in den Forellenstämmen TCO und BORN.

	C1QL4				C1QLAS				TCBP2			
TCO	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**
0	0.0083	0.0033			0.0004	0.0001			0.0098	0.0002		
6	0.0048	0.0024	-1.75	-1.13	0.0004	0.0001	1.05	0.38	0.0106	0.0014	1.09	0.14
12	0.0062	0.0034	-1.34	-0.90	0.0003	$4x10^{-5}$	-1.35	-0.45	0.0066	0.0015	**-1.48#**	-0.33
24	0.0117	0.0042	1.41	0.75	0.0003	0.0002	-1.20	-0.95	0.0064	0.0036	-1.52	-0.86
48	0.0049	0.0021	-1.69	-0.99	0.0003	0.0001	-1.40	-0.59	0.0041	0.0027	-2.39#	-1.57
72	0.0103	0.0067	1.24	0.94	0.0044	0.0042	12.17	12.01	0.0129	0.0106	1.32	1.09
7	0.0120	0.0041	1.44	0.75	0.0092	0.0054	25.50	16.72	0.0334	0.0130	3.41#	1.33
BORN												
0	0.0119	0.0060			0.0005	0.0002			0.0093	0.0020		
6	0.0126	0.0035	1.06	0.61	0.0002	$2x10^{-5}$	-2.70	-1.00	0.0073	0.0003	-1.27	-0.27
12	0.0138	0.0053	1.16	0.74	0.0001	$3x10^{-5}$	**-7.87***	-4.59	0.0015	0.0004	**-6.10***	-2.06
24	0.0098	0.0040	-1.22	-0.80	0.0001	$4x10^{-5}$	**-4.97#**	-2.88	0.0029	0.0013	**-3.17***	-1.52
48	0.0185	0.0076	1.56	1.02	0.0000	$2x10^{-5}$	**-10.15***	-5.54	0.0011	0.0001	**-8.33***	-1.91
72	0.0089	0.0074	-1.34	-1.32	0.0003	0.0001	-1.74	-0.73	0.0019	0.0004	**-4.91***	-1.47
7	0.0413	0.0350	3.48	3.43	0.0005	0.0002	1.10	0.52	0.0063	0.0006	-1.47	-0.34

	CLEC14A				CD93				CLEC4M			
TCO	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**
0	0.1766	0.0495			0.0090	0.0022			0.0368	0.0026		
6	0.2150	0.0269	1.22	0.37	0.0047	0.0013	-1.90	-0.70	0.0315	0.0063	-1.17	-0.25
12	0.1228	0.0200	-1.44	-0.47	0.0063	0.0007	-1.42	-0.38	0.0511	0.0074	**1.39#**	0.22
24	0.1062	0.0153	-1.66	-0.52	0.0068	0.0030	-1.33	-0.67	0.0440	0.0092	1.20	0.26
48	0.1310	0.0156	-1.35	-0.41	0.0054	0.0007	-1.66	-0.45	0.0267	0.0082	-1.38	-0.43
72	0.1114	0.0354	-1.59	-0.67	0.0056	0.0018	-1.61	-0.65	0.0262	0.0056	**-1.40#**	-0.31
7	0.1670	0.0181	-1.06	-0.32	0.0040	0.0014	**-2.22***	-0.95	0.0538	0.0089	**1.71#**	0.44
BORN												
0	0.2022	0.0245			0.0051	0.0025			0.0255	0.0080		
6	0.2067	0.0302	1.02	0.19	0.0044	0.0018	-1.15	-0.75	0.0187	0.0056	-1.36	-0.59
12	0.2062	0.0087	1.02	0.13	0.0053	0.0015	1.04	0.59	0.0254	0.0056	1.00	0.38
24	0.1791	0.0459	-1.13	-0.32	0.0044	0.0016	-1.14	-0.70	0.0214	0.0024	-1.19	-0.40
48	0.1480	0.0313	-1.37	-0.33	0.0059	0.0013	1.16	0.63	0.0271	0.0035	1.06	0.36
72	0.1103	0.0300	**-1.83***	-0.55	0.0045	0.0018	-1.14	-0.73	0.0216	0.0046	-1.18	-0.45
7	0.1987	0.0301	-1.02	-0.20	0.0079	0.0014	1.56	0.82	0.0311	0.0016	**1.22#**	0.37

	CLEC4M-1				C1q				C1s			
TCO	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**
0	0.0089	0.0009			0.1294	0.0056			0.0552	0.0101		
6	0.0037	0.0005	**-2.43***	-0.43	0.1602	0.0264	1.24	0.21	0.0420	0.0100	-1.32	-0.40
12	0.0081	0.0015	-1.11	-0.23	0.1466	0.0208	-1.09	-0.24	0.0486	0.0072	-1.14	-0.27
24	0.0077	0.0019	-1.16	-0.31	0.1749	0.0440	1.35	0.34	0.0450	0.0048	-1.23	-0.26
48	0.0037	0.0013	**-2.38***	-0.86	0.1331	0.0014	1.03	0.05	0.0335	0.0034	**-1.65#**	-0.35
72	0.0041	0.0011	**-2.17***	-0.64	0.1211	0.0219	-1.07	-0.20	0.0450	0.0092	-1.23	-0.34
7	0.0201	0.0039	**2.25***	0.50	0.1698	0.0324	1.31	0.26	0.0315	0.0057	**-1.76#**	-0.45
BORN												
0	0.0056	0.0020			0.1032	0.0134			0.0573	0.0176		
6	0.0029	0.0008	-1.91	-0.84	0.1347	0.0207	1.31	0.26	0.0442	0.0053	-1.30	-0.43
12	0.0041	0.0012	-1.38	-0.65	0.1333	0.0211	-1.01	-0.22	0.0393	0.0070	-1.46	-0.52
24	0.0027	0.0007	-2.07	-0.92	0.1239	0.0231	1.20	0.27	0.0429	0.0110	-1.34	-0.53
48	0.0052	0.0013	-1.08	-0.47	0.1184	0.0105	1.15	0.18	0.0405	0.0039	-1.41	-0.46
72	0.0038	0.0011	-1.49	-0.69	0.1054	0.0175	1.02	0.21	0.0433	0.0045	-1.32	-0.43
7	0.0129	0.0009	**2.30***	0.83	0.1639	0.0069	**1.59***	0.22	0.0476	0.0024	-1.20	-0.38

	MASP2				MASP3				C5			
TCO	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**
0	0.0051	0.0012			0.0050	0.0013			0.0001	0.0000		
6	0.0007	0.0001	**-6.78***	-1.85	0.0028	0.0008	-1.79	-0.67	-	-	-	-
12	0.0230	0.0160	4.54	3.34	0.0095	0.0025	1.91	0.72	-	-	-	-
24	0.0076	0.0060	1.49	1.23	0.0053	0.0021	1.07	0.51	0.0001	0.0000	-1.54	-1.08
48	0.0009	0.0003	**-5.39***	-2.30	0.0048	0.0010	-1.03	-0.35	0.0000	0.0000	**-4.73#**	-1.82
72	0.0021	0.0016	-2.43	-1.93	0.0090	0.0036	1.82	0.87	0.0007	0.0007	6.14	6.17
7	0.0166	0.0052	**3.27#**	1.29	0.0155	0.0050	**3.12#**	1.30	0.0007	0.0004	6.16	4.34
BORN												
0	0.0044	0.0011			0.0049	0.0009			0.0001	0.0000		
6	0.0004	0.0000	-9.91	-2.49	0.0320	0.0214	6.56	4.54	-	-	-	-
12	0.0033	0.0010	-1.35	-0.52	0.0080	0.0013	1.64	0.39	-	-	-	-
24	0.0052	0.0030	1.17	0.73	0.0100	0.0050	2.06	1.09	0.0000	0.0000	-2.11	-0.39
48	0.0026	0.0011	5.86	2.77	0.0085	0.0049	1.75	1.05	0.0001	0.0000	1.74	1.14
72	0.0010	0.0004	**-4.50#**	-2.26	0.0111	0.0028	**2.27#**	0.70	0.0002	0.0002	3.92	3.51
7	0.0067	0.0012	1.52	0.46	0.0068	0.0013	1.39	0.36	0.0003	0.0000	**5.63***	2.68

	C6				C8				C5aR			
TCO	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**
0	0.0230	0.0062			0.0015	0.0004			0.0575	0.0090		
6	0.0167	0.0046	-1.37	-0.53	0.0033	0.0017	2.23	1.29	0.3003	0.1602	5.23	2.91
12	0.0402	0.0118	1.75	0.70	0.0044	0.0010	**3.00***	1.11	0.0543	0.0074	-1.01	-0.22
24	0.0193	0.0046	-1.19	-0.43	0.0095	0.0075	6.43	5.39	0.0443	0.0083	-1.30	-0.32
48	0.0235	0.0051	1.02	0.35	0.0019	0.0006	1.30	0.53	0.0427	0.0053	-1.35	-0.27
72	0.0478	0.0120	**2.08#**	0.76	0.0172	0.0163	11.61	11.49	0.0298	0.0078	**-1.93#**	-0.59
7	0.0284	0.0148	1.23	0.72	0.0073	0.0037	4.91	2.88	0.0413	0.0121	-1.39	-0.46
BORN												
0	0.0128	0.0032			0.0020	0.0005			0.1166	0.0151		
6	0.0132	0.0013	1.03	0.28	0.0059	0.0038	2.98	2.08	0.0875	0.0148	-1.33	-0.28
12	0.0218	0.0050	1.70	0.43	0.0022	0.0007	1.13	0.81	0.0326	0.0030	**-3.58***	-0.69
24	0.0398	0.0211	3.11	1.82	0.0020	0.0005	1.02	0.39	0.0317	0.0076	**-3.67***	-0.89
48	0.0282	0.0092	2.20	0.91	0.0035	0.0009	1.79	0.67	0.0347	0.0091	**-3.36***	-0.98
72	0.0653	0.0173	**5.10***	1.86	0.0046	0.0024	2.31	1.36	0.0321	0.0097	**-3.64***	-1.20
7	0.0402	0.0128	3.15	1.28	0.0021	0.0003	1.07	0.34	0.0811	0.0062	-1.44	-0.22

	SERPIN1			
TCO	**relative mRNA-Expression**	**SEM**	**FC**	**SEM**
0	0.0048	0.0013		
6	0.0040	0.0009	-1.21	-0.43
12	0.0096	0.0030	2.00	0.82
24	0.0250	0.0198	5.20	4.35
48	0.0037	0.0012	-1.29	-0.55
72	0.0330	0.0308	6.89	6.67
7	0.0165	0.0081	3.44	1.92
BORN				
0	0.0022	0.0008		
6	0.0031	0.0006	1.38	0.55
12	0.0042	0.0015	1.88	0.95
24	0.0041	0.0009	1.82	0.53
48	0.0060	0.0013	**2.67***	1.11
72	0.0110	0.0053	4.94	2.96
7	0.0051	0.0010	**2.30#**	0.94

$p \leq 0.1$; * $p \leq 0.05$

F Signifikant regulierte Gene nach Infektion in den Kiemen

Tabelle 28 Überblick über signifikant regulierte Gene zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion in den Forellenstämmen TCO und BORN.

Tag nach Infektion	6h		12h		1d		2d		3d		7d	
	TCO	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**
signifikant hoch reguliert	C3aR CD59-2 C8	C3aR	C4 CLEC4M CD59-2 C1r/C1s C8 MBL2	C3aR CD59-1 C1r/C1s MBL2	MBL2	C4 C3aR CFI C1r/C1s MBL1	C3aR MBL2	C4 C3-1 CFH C3aR CFI C2-B SERPIN1 C1r/C1s MBL1 MBL2	C3-1 C6 MBL2	C7-1 C3-1 C3aR CFI C1r/C1s C6 MBL1 MBL2 MASP3	TCBP2 CLEC4M-1 CFD C3aR CD59-2 MBL2 MASP3 MASP2	CLEC4M-1 CLEC4M CFD CFH C1q C5 C3aR CD59-1 CD59-2 C2-B SERPIN1 MBL1
Tag nach Infektion	**6h**		**12h**		**1d**		**2d**		**3d**		**7d**	
	TCO	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**	**TCO**	**BORN**
signifikant herunter reguliert	C7-1 C7-2 C4 CD93 TCBP1 CLEC4M-1 C3-1 CD59-1 CFB1 MASP2	C7-2 TCBP1 CD59-1	C7-2 TCBP2	C7-2 C1QLAS TCBP1 TCBP2 C5aR		C1QLAS TCBP2 C5aR	C7-2 TCBP2 CLEC4M-1 C1s C3-1 C5 MASP2	C7-2 C1QLAS TCBP2 C5aR	CLEC14A CLEC4M-1 CLEC4M C5aR	TCBP2 C5aR MASP2	CD93	

Lebenslauf

Veröffentlichungen und Fachvorträge/Poster

2010

Judith M. Köbis, Alexander Rebl, Bernd Köllner, Klaus Wimmers, Tom Goldammer. Characterization of immunorelevant candidate genes in two rainbow trout strains via expression profiling in spleen. **(Poster)**
32rd Conference of the International Society of Animal Genetics in Edinburgh, 26.-30. Juli 2010

Judith M. Köbis, Alexander Rebl, Marieke Verleih, Tomáš Korytář, Bernd Köllner, Eckard Anders, Klaus Wimmers, Tom Goldammer.
Strukturelle und funktionelle Analyse von Genen des angeborenen Immunsystems in zwei Regenbogenforellenlinien mit different reaktivem Immunsystem. **(Vortrag, Veröffentlichung)**
Vortragstagung der DGfZ und GfT in Kiel, 15/16.September 2010

2011

Judith M. Köbis, Alexander Rebl, Marieke Verleih, Tomáš Korytář, Bernd Köllner, Carsten Kühn, Klaus Wimmers, Tom Goldammer.
Differente Regulation des Komplementsystems in zwei Regenbogenforellen-Linien **(Vortrag, Veröffentlichung)**
Vortragstagung der DGfZ und GfT in Freising-Weihenstephan, 06./07. September 2011

Alexander Rebl, **Judith M. Köbis**, Uwe Fischer, Fumio Takizawa, Marieke Verleih, Klaus Wimmers, Tom Goldammer. 2011. MARCH5 gene is duplicated in rainbow trout, but only fish-specific gene copy is up-regulated after VHSV infection. *Fish&Shellfish Immunology* 31: 1041–1050

2012

Judith M. Köbis, Alexander Rebl, Tom Goldammer.
Different expression patterns of innate immune genes in two rainbow trout strains. **(Vortrag, Veröffentlichung)**
14. Tag des Doktoranden, 25. Mai 2012

Judith M. Köbis, Alexander Rebl, Marieke Verleih, Thomáš Korytář, Bernd Köllner, Eckhard Anders, Klaus Wimmers, Tom Goldammer
Differente Expressionsmuster von Immungenen in zwei Regenbogenforellen-Linien. **(Veröffentlichung)**
Vortragstagung der DGfZ und GfT am in Halle/Saale, 12./13. September 2012

2013

Judith M. Köbis, Alexander Rebl, Carsten Kühn, Tom Goldammer. 2013. Comparison of splenic transcriptome activity of two rainbow trout strains differing in robustness under regional aquaculture conditions. *Molecular Biology Reports* 40: 1955-1966

Marieke Verleih, Alexander Rebl, Bernd Köllner, Tomáš Korytář, **Judith M. Köbis**, Carsten Kühn, Klaus Wimmers, Tom Goldammer. 2013. Iron–sulfur cluster scaffold (ISCU) gene is duplicated in salmonid fish and tissue and temperature dependent expressed in rainbow trout. *Gene* 512:251-258

Alexander Rebl, Marieke Verleih, **Judith M. Köbis**, Carsten Kühn, Klaus Wimmers, Bernd Köllner, Tom Goldammer. 2013. Transcriptome profiling of gill tissue in regionally bred and globally farmed rainbow trout strains reveals different strategies coping with thermal stress. *Marine Biotechnology*, DOI: 10.1007/s10126-013-9501-8

Judith M. Köbis, Alexander Rebl, Bernd Köllner, Tomáš Korytář, Carsten Kühn, Tom Goldammer.
Different expression of a C-type lectin gene and its transcript variant in two rainbow trout strains **(Poster, Veröffentlichung)**
First International Conference of Fish and Shellfish Immunology in Vigo, 25.-28. Juni 2013

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die Angegebenen benutzt habe. Alle Stellen im Text, die anderen Werken im Wortlaut oder sinngemäß entnommen sind, wurden als Entlehnung kenntlich gemacht. Gleiches gilt für alle beigegebenen Abbildungen, Tabellen und Anlagen.

Rostock,

Judith Köbis