

**Herstellung neuer monoklonaler Antikörper zur
Analyse der Expression verschiedener CD45
Isoformen auf Leukozyten des Haushuhns**

von

Daniela Silke Huhle

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Herstellung neuer monoklonaler Antikörper zur
Analyse der Expression verschiedener CD45
Isoformen auf Leukozyten des Haushuhns**

von

Daniela Silke Huhle

aus

Windhoek, Namibia

München, 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard
Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin P. Märtlbauer
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers
Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Für meine lieben

Eltern und Geschwister

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. ZIELSETZUNG	3
3. LITERATURÜBERSICHT.....	4
3.1 Protein-Tyrosin-Phosphatasen.....	4
3.2 CD45 beim Säuger.....	5
3.2.1 Aufbau.....	5
3.2.2 Alternatives Splicing und Glykosylierung	6
3.2.3 Funktion	8
3.2.3.1 Funktion bei B- und T- Zellen.....	9
3.2.3.2 Funktion bei anderen Leukozyten	11
3.2.4 Regulation	12
3.2.4.1 Dimerisierung.....	12
3.2.4.2 Lokalisation	14
3.3 CD45 bei anderen Vertebraten	15
3.4 CD45 beim Huhn	16
4. PUBLIKATION	18
5. DISKUSSION	30
6. ZUSAMMENFASSUNG	36
7. SUMMARY.....	38
8. LITERATURVERZEICHNIS	40
9. DANKSAGUNG	49

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Schematischer Aufbau des menschlichen CD45 Proteins. 6

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäure
Cbp	<i>csk-binding protein</i>
CD	Cluster Nomenklatur (<i>engl. cluster of differentiation</i>)
Csk	<i>C-terminal Src kinase</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
D1	Domäne 1
D2	Domäne 2
DC	<i>dendritic cell</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
GalNac	<i>N-acetylgalactosamine</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JAK	Janus Kinase
Lck	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
Lyn	<i>Lck/Yes novel tyrosine kinase</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MGL	<i>macrophage galactose-type lectin</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
N-terminal	Amino-terminal
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIR-B	<i>paired immunoglobulin-like receptor B, paired immunoglobulin-like receptor</i>
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
SH2	<i>src-homology 2</i>
SHP	<i>src homology phosphatase</i>
SIGLEC	<i>sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins</i>
Syk	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>

1. EINLEITUNG

Geflügel kommt eine wichtige Bedeutung in der Lebensmittelindustrie zu und Verluste durch Infektionskrankheiten können zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden führen. Wie die Beispiele aviäre Influenza oder Salmonellose zeigen, tragen Vögel auch entscheidend zur Verbreitung zoonotischer Krankheitserreger bei. Zur Verbesserung bestehender und Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten ist es wichtig die Pathogenese von Geflügelkrankheiten besser zu verstehen. Hierzu ist ein breitgefächertes Verständnis des aviären Immunsystems unabdingbar.

Das aviäre Immunsystem ist dem des Säugers erstaunlich ähnlich. Beide besitzen ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem und die aviäre Immunantwort läuft nach denselben Prinzipien ab wie die des Säugers. Das Immunsystem ist in der Lage ein Pathogen zu erkennen, woraufhin eine Reihe an Effektorfunktionen ausgelöst werden, mit deren Hilfe der Erreger bekämpft und eliminiert werden soll. Gleichzeitig kommt es zur Immunregulation, welche verhindert, dass das Immunsystem den eigenen Körper angreift, was zu Allergien oder Autoimmunerkrankungen führen könnte. Schlussendlich ist auch das aviäre Immunsystem in der Lage ein immunologisches Gedächtnis zu generieren um bei erneuter Infektion eine unmittelbare und stärkere Immunantwort auszulösen [1].

Die reversible Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen stellt einen zentralen Mechanismus diverser zellulärer Signaltransduktionswege dar und reguliert zahlreiche Zellfunktionen, wie Zellentwicklung, Proliferation, Differenzierung, Aktivierung und Apoptose [2, 3]. Katalysiert wird dies durch Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKasen), welche Tyrosinreste der Proteine phosphorylieren und durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen), welche die Reste dephosphorylieren. In allen Zellen des Immunsystems kommt es in hohem Maße zur Tyrosin-Phosphorylierung. Hier regelt das Zusammenspiel von Phosphorylierung und Dephosphorylierung zum Beispiel die T-Zell Aktivierung nach Bindung eines Antigens oder die Zytokin-vermittelte Proliferation [4, 5]. Sowohl PTKasen als auch PTPasen sind somit ein wichtiger Bestandteil bei der Aufrechterhaltung einer physiologischen Immunantwort.

Seit über 40 Jahren steht CD45, die erste identifizierte transmembranöse Protein-Tyrosin-Phosphatase, als Prototyp derer im Mittelpunkt intensiver Forschung. Diese PTPase ist beim Säuger auf allen kernhaltigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs vorhanden [6, 7]. Als Molekül mit hohem Molekulargewicht umfasst CD45 auf Lymphozyten ca. 10% des gesamten auf der Zelloberfläche exprimierten Proteins [7]. Durch alternatives Splicing dreier

Exons der Amino (N)-terminalen Domäne entstehen verschiedene Isoformen, welche je nach Zellart, Differenzierungsgrad und Aktivierungszustand unterschiedlich exprimiert werden [8]. Säuger CD45 kommt eine wichtige Rolle in der Regulation der Antigen-Rezeptor-Signaltransduktion der Lymphozyten zu [8]. Desweiteren ist CD45 an Fc-Rezeptor- und Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signaltransduktion in Mast- bzw. dendritischen Zellen beteiligt [9, 10]. Außerdem reguliert diese PTPase die Zelladhäsion, Migration und Zytokin-Rezeptor Signaltransduktion [11-13]. Somit ist CD45 ein wichtiger Bestandteil des angeborenen und erworbenen Immunsystems.

Auch beim Huhn existieren multiple CD45 Isoformen mit intrinsischer PTPase-Aktivität [14]. Jedoch sind Funktion, Regulation und Expression einzelner Isoformen weitgehend unerforscht.

2. ZIELSETZUNG

Im Säuger können kernhaltige hämatopoetische Zellen mit Hilfe der exprimierten CD45 Splicevarianten entsprechend ihres Aktivierungszustandes, Differenzierungsgrades und Zellart in Subpopulationen unterteilt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe monoklonaler Antikörper (mAk) die Verteilung spezifischer CD45 Isoformen auf Immunzellen des Huhns zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Expression bei $\gamma\delta$ T-Zellen gelegt, da bis heute nur wenige Oberflächenmoleküle identifiziert werden konnten, mit deren Hilfe spezielle funktionelle Subpopulationen dieser Zellen definiert werden können.

Für die Generierung CD45-spezifischer mAk sollten aus der Milz gewonnene $\gamma\delta$ T-Zellen mit Hilfe der Zytokinkombination Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-12 (IL-12) *in vitro* expandiert und anschließend für die Immunisierung eingesetzt werden. Die so gewonnenen CD45-spezifischen Antikörper sollten anschließend für die Untersuchung der Gewebeverteilung mittels Durchflusszytometrie verwendet werden.

Zur Ermittlung der Spezifität der generierten mAk sollten verschiedene Splicevarianten von CD45 kloniert und exprimiert werden. Die zur Expression von CD45 transfizierten Zellen sollten anschließend für die Beurteilung der Reaktivität der mAk eingesetzt werden.

Durch die Analyse der genomischen CD45 Struktur und dem Vergleich mit den entsprechenden Säugergenen konnte die Region, die sehr wahrscheinlich für die Entstehung verschiedener Splicevarianten verantwortlich ist, identifiziert werden. Zur Untersuchung der am alternativen Splicing beteiligten Exons und der Gewebeverteilung verschiedener Isoformen sollte die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern angewendet werden.

3. LITERATURÜBERSICHT

3.1 PROTEIN-TYROSIN-PHOSPHATASEN

Die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung sind Reaktionen, welche eine zentrale Rolle bei der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel der Entwicklung, Differenzierung, Teilung und Aktivierung, spielen. Das strikt geregelte Zusammenspiel von PTKasen und PTPasen sorgt für ein Gleichgewicht der Phosphorylierung und Dephosphorylierung.

Mitglieder der Superfamilie der PTPasen besitzen zwar nur sehr geringe Ähnlichkeit in ihrer Sequenz, doch sie alle weisen ein gemeinsames Signaturmotiv innerhalb der PTPase-Domäne auf [2, 15]. Generell werden PTPasen anhand ihrer Substratspezifität und molekularen Masse in 3 Familien eingeteilt: die Familie der klassischen PTPasen, die LMW-PTPasen („Low Molecular Weight“) und die dualspezifischen PTPasen (DSPasen). Die klassischen PTPasen können wiederum unterteilt werden in transmembranöse, Rezeptor-ähnliche und intrazelluläre PTPasen. CD45 gilt als Prototyp der transmembranösen PTPasen.

3.2 CD45 BEIM SÄUGER

CD45 ist eine Typ-1 transmembranöse Protein-Tyrosin-Phosphatase, welche bei Säugern auf allen kernhaltigen Körperzellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird [6, 7, 16].

3.2.1 Aufbau

Dieses Molekül ist charakterisiert durch eine große extrazelluläre Region (beim Menschen 391-552 Aminosäuren [AS], je nach Isoform), einer einzelnen transmembranösen Domäne (22 AS) und einem umfangreichen zytoplasmatischen Anteil (705 AS) (siehe Abbildung 1) [7]. Die hochglykosylierte extrazelluläre Region besitzt eine variable N-terminale Domäne aufgrund alternativen Splicings dreier Exons, eine Cystein-reiche Region und eine Domäne bestehend aus drei TypIII-Fibronectin-Wiederholungseinheiten. Die intrazelluläre Region setzt sich aus einer membrannahen Tyrosin-Phosphatase-Domäne (D1) und einer Carboxy (C)-terminalen Domäne (D2) zusammen, welche CD45 mit dem Zytoskelett durch das Verbindungs-Molekül Fodrin verbindet und eine regulatorische Funktion übernimmt [17, 18].

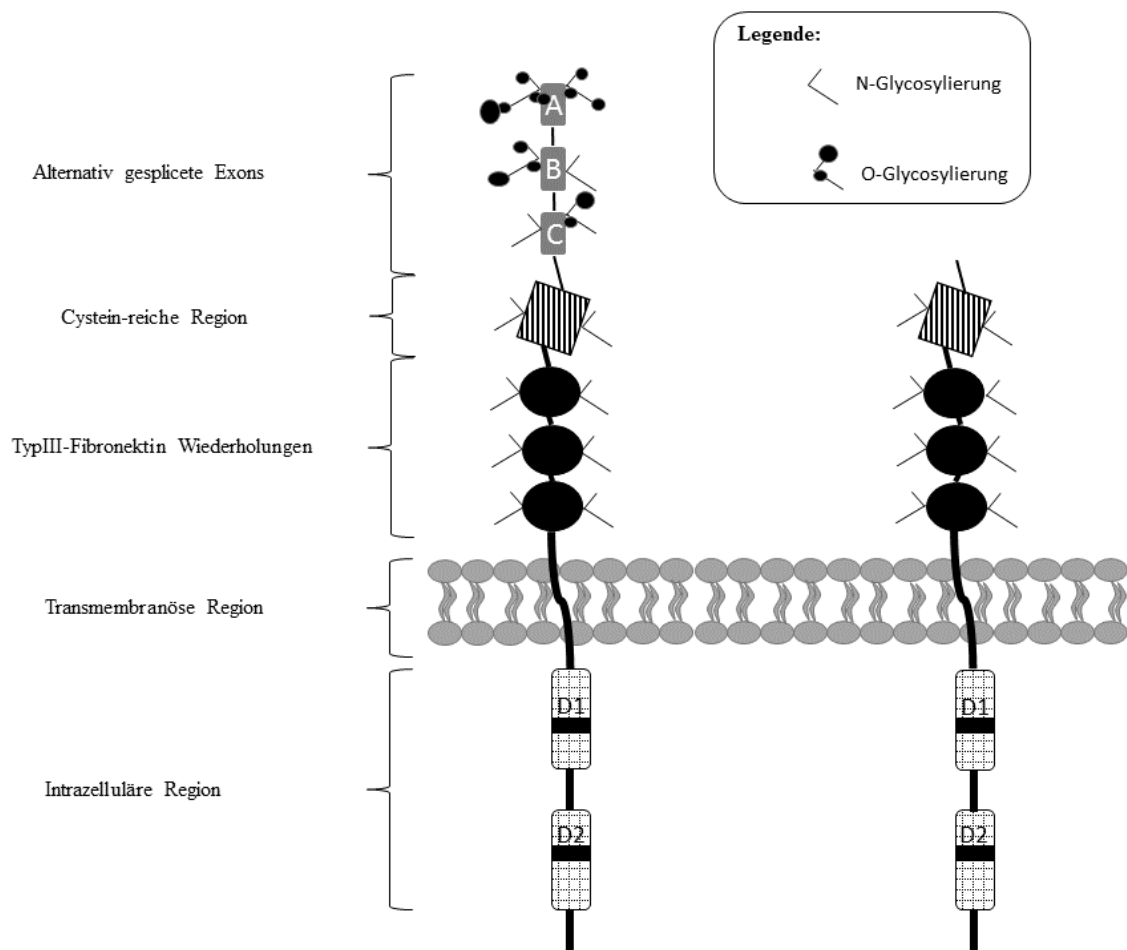


Abbildung 1. Schematischer Aufbau des menschlichen CD45 Proteins.

Die extrazelluläre Region besteht aus einer variablen N-terminalen Domäne, charakterisiert durch das Splicing dreier Exons (A, B und C), gefolgt von einer Cystein-reichen Region und 3 TypIII-Fibronectin Wiederholungen. CD45 besitzt außerdem eine einzelne transmembranöse Region und eine intrazelluläre Region, bestehend aus den 2 Tandem-Phosphatase-Domänen D1 und D2. Extrazellulär ist CD45 hochgradig glykosyliert, wobei N-Glykosylierung auf der gesamten Ektodomäne zu finden ist und die variable N-terminale Region durch O-Glykosylierung gekennzeichnet ist. Die Isoform CD45RABC besitzt alle gespliceten Exons (links), wohingegen CD45R0 (rechts) keine der 3 Exons beinhaltet.

3.2.2 Alternatives Splicing und Glykosylierung

Verschiedene Isoformen von CD45 werden beim Säuger durch das alternative Splicing dreier nahe dem N-Terminus gelegenen Exons generiert [19]. Die Bezeichnung dieser Exons 4-6 als A, B und C gab den Anstoß zur Verwendung der heute weitverbreiteten Isoform-Nomenklatur (zum Beispiel CD45R0, CD45RABC). Hierbei werden die Isoformen nach den enthaltenen Exon-Produkten benannt. Somit bezeichnet der

Terminus 'CD45R0' eine Variante von CD45, bei der die Exons 4-6 fehlen. Das 'R' steht dabei für 'restricted to'. Je nach Isoform und variierender Glykosylierung beträgt das molekulare Gewicht ca. 180 bis 240kDa [8]. Die exprimierte Isoform und deren Glykosylierung hängt von der Zellart, dem Differenzierungsgrad und dem Aktivierungszustand ab [8, 20, 21]. Naive T-Zellen tragen somit vornehmlich Isoformen von CD45 mit größerem molekularem Gewicht. Nach Aktivierung der Zellen verschwinden diese zunehmend und die Variante mit dem geringsten molekularen Gewicht (CD45R0) wird hochreguliert. Diese ist auch die prädominante Splicevariante auf Gedächtnis-T-Zellen [8, 22, 23]. Naive B-Zellen exprimieren fast ausschließlich die Isoform CD45RABC [8, 21]. Auch andere Leukozyten können anhand der Expression von CD45 unterschieden werden. Naive Natürliche Killerzellen (NK) tragen den Phänotyp CD45RA⁺R0⁻, aktivierte NK-Zellen hingegen den Phänotyp CD45RA⁺R0⁺ [24].

CD45 ist an der Cystein-reichen Region und den drei TypIII-Fibronectin Einheiten stark N-glykosyliert. Die Untersuchung der auf CD45 vorhandenen N-Glykane humaner peripherer mononucleärer Blutzellen (PBMC) zeigte, dass diese vor allem vom komplexen Typ sind und primär tri- und tetraantennäre Strukturen aufweisen und poly-(N-Acetyllactosamin)-Gruppen tragen [25]. Die intakte N-Glykosylierung der CD45 Moleküle im Golgi-Apparat ist ausschlaggebend für die Stabilität und den Transport dieser an die Zelloberfläche [26]. Die O-Glykane der N-terminalen Region von CD45 sind vornehmlich Core-1 und Core-2 Strukturen [27]. Die Glykosylierung der CD45 Isoformen ändert sich im Laufe des Lebens einer Zelle. So wird sie beeinflusst durch Glykosyltransferasen während der Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung der Zelle [28]. Folglich hängt die Glykosylierung eines CD45 Moleküls nicht allein von den vorhandenen Exons der Isoform ab, sondern auch vom Status der exprimierenden Zelle. Die Änderung der Glykosylierung kann dazu beitragen, dass bestimmte Liganden präferenziell gebunden werden. Obwohl bis heute kein spezifischer Ligand für CD45 gefunden wurde, gibt es doch eine Reihe an Substraten, die gebunden werden können, da sie spezielle Zuckerreste erkennen. Zu diesen gehören zum Beispiel Galektin-1 und -3, CD22 und MGL (macrophage galactose-type lectin). Galektin-1 ist ein β -Galaktoside-bindendes Protein, welches an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt ist [29]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass CD45 eine regulatorische Funktion bei dem durch Galektin-1 vermittelten Zelltod von T-Zellen einnimmt [30, 31]. CD45 ist außerdem am Galektin-3-vermittelten Zelltod der T-Zellen beteiligt [32].

Ein weiteres Glykan-bindendes Protein, welches an CD45 binden kann, ist CD22. Es ist ein zur SIGLEC-Familie gehörendes Lektin, welches auf B-Zellen exprimiert wird und an der Signaltransduktion beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, dass CD22 vor allem CD45R0 bindet [33]. Das humane Lektin MGL, welches auf unreifen dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen vorkommt, bindet an terminale N-Acetylgalaktosamin (GalNAc)-Strukturen auf CD45 und reguliert die Interaktionen zwischen Effektor-T-Zelle und Antigenpräsentierender Zelle (APC) [34]. Die Interaktion hat einen negativ regulierenden Effekt auf die T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signaltransduktion. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie die T-Zell-Proliferation werden gehemmt und die Apoptose der T-Zelle induziert [35].

3.2.3 Funktion

Obwohl CD45 einen Leukozytenmarker darstellt, welcher bei Säugern auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, bis auf Thrombozyten und Erythrozyten, exprimiert wird, stammt das meiste Wissen über dieses Molekül von Untersuchungen an B- und vor allem T-Lymphozyten. CD45 kommt eine hohe Bedeutung in der Zellentwicklung, Aktivierung, Seneszenz und Apoptose zu. Das Glykoprotein kommt auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen in hoher Dichte vor und umfasst ca. 5-10% des gesamten auf der Oberfläche exprimierten Proteins [36, 37].

Die intrazelluläre Region von CD45 besteht aus der membrannahen D1 Domäne und der C-terminalen D2 Domäne. Beide Domänen teilen Homologien in Sequenz und Aufbau, doch einzig D1 besitzt PTPase-Aktivität [38]. D2 übernimmt die Funktion das Enzym zu stabilisieren und ist wichtig für dessen optimale Funktion [38]. Sie ist in der Lage Substrat zu binden und reguliert die Phosphataseaktivität von D1 [18]. Die D2-Domäne verbindet CD45 mit dem Zytoskelett, indem sie an Fodrin (Spektrin-ähnliches Protein) oder Spektrin bindet, wodurch die PTPase-Aktivität von D1 gesteigert wird. [39]. Für T-Zellen konnte gezeigt werden, dass der Transport von CD45 an die Oberfläche durch Bindung der intrazellulären Region an Spektrin gefördert wird. Wenn dieser Prozess gestört ist, verhindert dies die Aktivierung der T-Zellen [40].

3.2.3.1 Funktion bei B- und T- Zellen

Die Antigen-Rezeptor-Signaltransduktion hängt bei T- und B-Zellen von der Aktivierung bestimmter Familienmitglieder der Src-Kinasen und nachfolgend Syk-Kinasen ab [8, 41, 42]. Bindung an den T- bzw. B-Zell-Rezeptor führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten in den ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) der Rezeptoren durch Src-Proteinkinasen. Diese sind nun imstande die Syk-Familienmitglieder ZAP-70 (zeta-chain-associated protein kinase 70) bzw. Syk zu binden, welche daraufhin von den Src-Kinasen phosphoryliert und aktiviert werden. Aktivierte Src- und Syk-Proteinkinasen sind in der Lage weitere Schlüsselmoleküle zu phosphorylieren, was anschließend zu einer breiten Palette an zellulären Reaktionen führt.

Die Aktivität der Src-Familienmitglieder der PTKasen wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung zweier spezifischer Tyrosinreste reguliert. Ein C-terminaler Rest ist bedeutend für die negative Regulation und ein Rest in der Kinase-Domäne ist wichtig für die positive Regulation. Letzterer ist der Hauptort für Autophosphorylierung; durch Phosphorylierung dieses Tyrosinrests kommt es zur gesteigerten Kinaseaktivität. Zusätzlich zur Dephosphorylierung des C-terminalen regulatorischen Tyrosins ist CD45 auch in der Lage den Tyrosinrest der katalytischen Domäne zu dephosphorylieren. In dieser Weise wirkt CD45 regulatorisch auf die Aktivität der Src-Kinasen [43-46]

Lck und Lyn, Mitglieder der Src-Superfamilie, sind die am besten charakterisierten Substrate für CD45 in T- bzw. B-Zellen [47, 48]. Durch Dephosphorylierung des C-terminal gelegenen inhibitorischen Tyrosins der Src-Familienmitglieder wirkt CD45, als Gegenspieler der Tyrosin-Protein-Kinase Csk (C-terminal Src kinase), positiv regulierend auf die Antigen-Rezeptor-Signaltransduktion. Die Phosphorylierung des C-terminalen regulatorischen Tyrosins von Src-Kinasen durch Csk führt zu einer intramolekularen Interaktion der Kinase-Domäne mit der regulatorischen SH2-Domäne. Dies führt zu einer gefalteten inaktiven Konformation der Src-Kinase [49]. Kommt es nun zur Dephosphorylierung der C-terminalen Domäne durch CD45, entfaltet sich diese Konformation und es entsteht eine Kinase, die aktivierbar ist. Clustering der Src-Kinasen während einer Antigenbindung führt zur Transphosphorylierung des Tyrosinrests der Aktivierungsschleife der katalytischen Domäne, welche von selbiger verdrängt wird und es entsteht eine aktive Kinase [46]. CD45 ist jedoch bei beiden, Lck und Lyn, in der Lage auch den Tyrosinrest der Aktivierungsschleife in der katalytischen

Domäne zu dephosphorylieren. Auf diese Weise wird die Kinaseaktivität verringert und die Src-Kinase wieder in den aktivierbaren Zustand überführt [50-52]. Durch die Dephosphorylierung beider Tyrosinreste reguliert CD45 die Kinaseaktivität der Src-Familienmitglieder und wirkt darauf hin, diese in einem aktivierbaren Zustand zu halten.

Für die Proteinkinase Lck ist bekannt, dass ihr am weitesten N-terminal gelegenes Segment, die *unique domain*, mit den zytoplasmatischen Anteilen der T-Zell-Co-Rezeptoren CD4 und CD8 assoziiert [53-55]. Während der Entstehung eines TCR-MHC-Peptid-Komplexes wird Lck an diesen rekrutiert und zwar über die Assoziation mit CD4 bzw. CD8 [56].

Bei T-Zellen wurde die Rolle von CD45 bei der Entwicklung von Thymozyten in der Maus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CD45 Knockout-Mäuse eine Blockade beim Übergang von der CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven (DP) Phase zur einfach positiven Phase hatten. Sie besaßen somit nur 5-10% der normalen Anzahl peripherer T-Zellen [57, 58]. Für B-Zellen konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen von CD45 deren Entwicklung zwar stattfindet, aber die Menge und Zusammensetzung der Subpopulationen verändert ist [58]. Ein Kalzium-mobilisierendes Signal konnte nur dann durch den BCR erzeugt werden wenn CD45 auf der Zelloberfläche exprimiert war [59].

CD45 ist zudem eine JAK-Phosphatase. Durch die direkte Bindung an Janus Kinasen (JAKs) und deren darauffolgende Dephosphorylierung ist CD45 in der Lage den JAK-STAT (signal transducers and activators of transcription)-Signalweg zu unterdrücken. Die PTPase hat somit einen inhibitorischen Effekt auf die Zytokin-Rezeptor-Signaltransduktion multipler Zytokine, wie zum Beispiel IL-3, IL-4, Erythropoetin (EPO) und Interferon- α (IFN- α) [12]. Somit könnte CD45 zum Beispiel eine regulatorische Rolle bei viralen Infektionen spielen oder bei der Entwicklung von Erythrozyten.

3.2.3.2 Funktion bei anderen Leukozyten

Auch in anderen Leukozyten ist CD45 an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt. So reguliert diese PTPase die Fc-Rezeptor- und Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktion in Mastzellen bzw. dendritischen Zellen, welche durch Antigenbindung ausgelöst wird.

Ähnlich wie bei der T- bzw. B-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion kommt es bei Antigenbindung an IgE (Immunglobulin E) zur Quervernetzung der Fc ϵ RI auf Mastzellen. Dies führt in initialen Reaktionen zur Tyrosin-Phosphorylierung der ITAMs der β - und γ -Untereinheiten von Fc ϵ RI durch die Src Protein-Tyrosin-Kinase Lyn und zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Moleküle [60, 61]. Bei Mastzellen konnte gezeigt werden, dass CD45 für die IgE-abhängige Degranulation wichtig ist und dass CD45 Knockout-Mäuse gegenüber IgE-abhängiger Anaphylaxie resistent sind [10].

In dendritischen Zellen korreliert der Effekt von CD45 auf die TLR-induzierte Zytokinproduktion mit der Identität des aktivierten Toll-like Rezeptors [9]. Die Untersuchung dendritischer Zellen von CD45 Knockout-Mäusen zeigte einen negativen Effekt von CD45 auf TLR2 und 9 und einen positiven Effekt auf TLR3 und 4. Dies impliziert eine negativ regulatorische Funktion für CD45 auf MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88)-abhängige Zytokinsignalisierung.

Die Adhäsion von Makrophagen und auch anderen Leukozyten an die extrazelluläre Matrix und an andere Zellen wird durch Zelladhäsionsmoleküle der Integrin-Familie mediiert. Kommt es bei Makrophagen zu einer Integrin-abhängigen Zelladhäsion, werden Src-Kinasen aktiviert. CD45 ist an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt, indem es durch Dephosphorylierung des Tyrosinrests der katalytischen Domäne der Src-Kinasen deren Aktivität senkt. Somit wird die Zelladhäsion aufrechterhalten [11].

Eine Studie an neutrophilen Granulozyten mit CD45-spezifischen mAk konnte zeigen, dass die durch Leukotrien B4 und C5a verursachte Chemotaxis der Zellen durch Bindung der Antikörper gehemmt werden konnte [13]. Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Src-Kinasen Hck und vor allem Fgr die Chemokin vermittelte Signaltransduktion negativ beeinflussen, indem sie PIR-B (paired immunoglobulin-like receptor) phosphorylieren [62]. Myeloide Zellen tragen eine Vielzahl an Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, welche inhibitorische Funktionen erfüllen. Zu diesen zählt auch PIR-B. Er besitzt zytoplasmatisch ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)-Domänen und ist somit in der Lage SHP-1/SHP-2 (src homology phosphatase) zu rekrutieren. Durch Phosphorylierung von PIR-B durch die Src-Kinasen wird dieses

Molekül konstitutiv in einem phosphorylierten Zustand gehalten und übt somit einen kontinuierlichen inhibitorischen Effekt aus. Kommt es nun zur Bindung eines Liganden an seinen Chemokin-Rezeptor, wird PIR-B (transient) dephosphoryliert und die Bindung an SHP-1 und SHP-2 lässt nach. Es wird vermutet, dass CD45 die Aktivität der Src-Kinasen Hck und Fgr reguliert und somit an der Chemotaxis beteiligt ist.

CD45 ist desweiteren an der Regulation des induzierbaren Oxidativen Bursts humaner Phagozyten beteiligt, wahrscheinlich durch die Kopplung spezifischer Oberflächenrezeptoren an nachgeschaltete Tyrosin-Kinase-anhängige Signaltransduktionswege in aktivierten Phagozyten [63].

3.2.4 Regulation

Obwohl die Forschungen an CD45 beim Säuger bis in die 1960er zurückreichen, weiß man bis heute nur sehr wenig über die Regulation ihrer Phosphataseaktivität. Es konnte bisher kein Ligand identifiziert werden, welcher spezifisch die Phosphataseaktivität von CD45 reguliert. Aufgrund mangelnder Beweise für einen solchen Liganden ging man dazu über auch nach anderen möglichen Regulationsmechanismen für CD45 zu suchen.

3.2.4.1 Dimerisierung

Basierend auf der Untersuchung der kristallinen Struktur der D1 Domäne der murinen RPTP α (receptor-like protein-tyrosine phosphatase alpha) und deren Sequenzähnlichkeit zu CD45 wurde ein Modell für die Regulation von CD45 durch Dimerisierung vorgeschlagen. Hierbei wird ihre Phosphataseaktivität durch Wechselwirkungen eines N-terminal gelegenen Keils des einen D1-Monomers mit der katalytischen Stelle des zweiten Monomers gehemmt [64]. Die Untersuchungen eines Chimären, bestehend aus der extrazellulären und transmembranösen Region des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) und der intrazellulären Region von CD45 unterstützen dieses Modell. Liganden-induzierte Dimerisierung des Chimären hemmten die Antigen-abhängige T-Zell-Aktivierung in einer CD45-defizienten Zelllinie [65]. Bisläng konnte dieses Modell jedoch nicht ausreichend belegt oder widerlegt werden. Die Untersuchung der kristallinen Struktur des D1D2 Segments der humanen PTPase CD45 ergab, dass eine Hemmung durch Wechselwirkungen dieses Keils nicht möglich sei [66]. Bei der Untersuchung rekombinanter Anteile der

zytoplasmatischen Region wurde ersichtlich, dass die D1 Domäne allein primär als Dimer vorkam, wobei die rekombinante D1D2 Variante primär als Monomer vorkam. [38]. Proteine in Lösung sind jedoch dynamisch und die Untersuchung der kristallinen Struktur allein ist nicht ausreichend um dieses Modell zu widerlegen oder zu belegen und man weiß noch nicht ob die intrazelluläre Region inhibitorische Dimere bilden kann [67].

Durch das alternative Splicing der drei Exons, welche multiple Bildungsstellen für O-verknüpfte Kohlenhydrate kodieren, entstehen Isoformen unterschiedlicher Form und negativer Ladung. Die Expression dieser Isoformen auf verschiedenen Leukozytenpopulationen wird strikt reguliert. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass die extrazelluläre Domäne von CD45 Dimere bilden kann und dass diese Dimerisierung spontan abläuft und von der exprimierten Isoform abhängt. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Isoformen in primären und transfizierten T-Zellen unterschiedlich homodimerisieren und dass R0 effizienter und schneller dimerisiert als größere Isoformen. Die Dimerisierung jedoch war nicht abhängig von der intrazellulären Domäne, sondern von der O-Glykosylierung und Sialylierung der extrazellulären Region [68]. Es ist noch einiges an Arbeit nötig um diese gegensätzlichen Ergebnisse zu verstehen.

3.2.4.2 Lokalisation

Die Position von CD45 in der Plasmamembran ist nicht statisch und es gibt Beweise dafür, dass die Relokalisation von CD45 in und aus sogenannten lipid rafts wichtig ist für die Regulation des Zugriffs auf Substrate.

Lipid rafts (Lipidflöße) (auch GEM, glycolipid-enriched membrane subdomain) sind spezielle Bereiche in der Zellmembran. Sie sind reich an Cholesterol und Sphingolipiden und daher unlöslich in ionischen Detergenzien, weshalb sie auch als detergent-resistant membranes (DRMs) bezeichnet werden.

In naiven Lymphozyten ist ca. 5% des gesamten enthaltenen CD45 in lipid rafts lokalisiert und diese Assoziation ist Cholesterol-abhängig [52, 69]. Die Lokalisation in diesen rafts ist jedoch dynamisch und abhängig von der Aktivierung der Zellen. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Konzentration von CD45 in den rafts nach Aktivierung der Zellen sank, dies aber ein dynamischer Prozess ist. Auch weitere Moleküle sind in den rafts vorhanden, zum Beispiel Src-PTKasen, Csk binding protein (Cbp) und Csk. In naiven T- Zellen ist Cbp, ein Transmembranprotein, phosphoryliert und mit Csk assoziiert, weshalb man annimmt, dass Cbp maßgeblich an der negativen Regulation der T-Zell-Aktivierung beteiligt ist [70]. Nach der T-Zell-Aktivierung kommt es zur Dephosphorylierung von Cbp, wahrscheinlich durch CD45, und anschließender Dissoziation von Csk. Man nimmt an, dass in naiven Zellen durch die Aktivität von Csk vorrangig ein hemmendes Milieu vorliegt mit phosphorylierten inaktiven CD45-Substraten, darunter Src-PTKasen. Nach T-Zell-Aktivierung wird dies, durch die Aktivität von CD45, welches vermutlich transient in die lipid rafts einwandert, in ein aktiviertes umgewandelt. Man nimmt außerdem an, dass die Wanderung von CD45 und Csk aus diesen lipid rafts wichtig sein könnte für die Aufrechterhaltung der TCR-Signalisierung und Aktivierung [46, 70, 71]. Wie bei dem Modell der Dimerisierung ist auch in diesem Bereich noch umfangreiche Forschung vonnöten um die genauen Mechanismen der Wanderung von CD45 in und aus lipid rafts zu verstehen. Weitere Mechanismen zur Regulation der Phosphataseaktivität von CD45 sind Phosphorylierung und Oxidation. Es ist bekannt, dass die Casein-Kinase 2 (CK2) eine Region innerhalb der D2-Domäne des CD45 phosphorylieren kann und somit die Phosphataseaktivität von D1 *in vitro* steigert [72]. In neutrophilen Granulozyten kann die Aktivität von CD45 durch reaktive Sauerstoff-Zwischenprodukte gehemmt werden [73].

3.3 CD45 BEI ANDEREN VERTEBRATEN

CD45 Moleküle konnten nicht nur bei verschiedenen Säugern identifiziert werden [74-79]. Gene, welche Homologe des Säuger CD45 kodieren wurden auch im Genom anderer Vertebraten identifiziert, einschließlich Huhn [80], Hornhai (*Heterodontus francisci*) [81], Schleimaal (*Eptatretus stoutii*) [82], Meerneunauge (*Petromyzon marinus*) [83], Kugelfisch (*Fugu rubripes*) [84], Karpfen (*Cyprinus carpio*) [85] und getüpfelter Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) [86].

Die Analyse der verschiedenen CD45 Sequenzen ergab, dass die intrazelluläre und transmembranöse Domäne hochkonserviert sind. Die extrazelluläre Region jedoch weist nur wenige Sequenzhomologien auf, obwohl das alternative Splicing der N-terminalen Region phylogenetisch konserviert ist. Interessanterweise unterscheidet sich das Splicing nicht nur in der Anzahl der gespliceten Exons. Beim Meerneunauge gibt es Beweise dafür, dass nicht nur ganze Exons gespliced werden, sondern auch eine Hälfte, ein Drittel oder zwei Drittel eines Exons [83].

Auch beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) konnten mit Hilfe verschiedener mAbs multiple Determinanten hoher molekularer Masse auf Leukozyten identifiziert werden, welche Tyrosin-Phosphataseaktivität aufweisen. Dies legt nahe, dass unterschiedliche CD45 Varianten auch bei Amphibien existieren [87, 88].

3.4 CD45 BEIM HUHN

Das Homolog zum Säuger CD45 wurde beim Huhn Ende der Achtzigerjahre des letzten Jahrhunderts entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Molekül beim Huhn auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert ist. Es fehlt jedoch auf Erythrozyten, welche beim Huhn kernhaltig sind [14, 89]. In geringerer Dichte findet sich CD45 auch auf den, beim Huhn ebenfalls kernhaltigen, Thrombozyten [90].

Wie beim Säuger, existieren auch beim Huhn CD45 Varianten mit unterschiedlicher molekularer Masse. Eine Immunpräzipitationsstudie zeigte, dass in der Bursa eine Variante hoher molekularer Masse exprimiert wird (215kDa), wohingegen im Thymus Isoformen niedrigerer molekularer Masse gefunden werden konnten [14]. Milzzellen und PBL enthalten multiple Isoformen unterschiedlicher molekularer Masse [14, 89].

Auch Hühner CD45 weist intrinsische Phosphotyrosin-Phosphataseaktivität auf. Dies konnte mit Hilfe einer Studie gezeigt werden, in welcher der spezifische mAk LT40 jegliche PTPase-Aktivität von aus Thymuszellen generierten Membranlysaten hemmte [14]. Desweiteren dephosphoryliert dieses Molekül die Protein-Tyrosin-Kinasen c-Src und v-Src *in vitro* und steigert die Kinaseaktivität von c-Src [91].

Vergleichende Sequenzanalyse von humanem und Hühner CD45 ergab, dass die intrazelluläre und transmembranöse Region hochkonserviert ist, wobei die juxtamembranöse D1 Domäne sogar eine 84%ige Homologie aufweist [81]. Auch die Gesamtstruktur des Moleküls ist erhalten: die extrazelluläre Region von CD45 besteht beim Huhn aus 3 TypIII-Fibronektin Einheiten, einer Cystein-reichen Region und einer variablen N-terminalen Domäne. Die Ektodomäne besitzt auch hier multiple Bildungsstellen für N- und O-glykosidisch verknüpfte Kohlenhydratreste. Lediglich die Proteinsequenz der extrazellulären Region besitzt sehr geringe Homologie zum Säuger [81].

Beim Säuger werden unterschiedliche Isoformen von CD45 durch alternatives Splicing der Exons 4 bis 6 generiert. Umfangreiche Studien an verschiedenen Wirbeltieren zeigen eine phylogenetische Konservierung der Eigenschaft des alternativen Splicings der N-terminalen Region von CD45. Die Anzahl und die Identität dieser Exons unterscheiden sich jedoch beträchtlich. So werden beim Huhn und beim Hornhai drei Exons alternativ gespliced [80, 81], wohingegen beim getüpfelten Gabelwels 18 solcher Exons identifiziert werden konnten [86].

Eine Besonderheit besteht im Huhn in der hohen Anzahl an $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Lymphozyten im peripheren Blut bestehen bis zu 50% aus $\gamma\delta$ T-Zellen [92]. Doch trotz der großen Menge ist diese Zellpopulation im Huhn noch weitestgehend unerforscht. Aufgrund des Mangels an identifizierten Oberflächenmolekülen ist es schwierig funktionelle Subpopulationen dieser Zellart zu identifizieren. Beim Säuger ist es möglich, aufgrund der unterschiedlichen Expression einzelner CD45-Isoformen, Leukozyten mit Hilfe von mAk in funktionelle Subpopulationen einzuteilen. Da auch beim Huhn verschiedene Isoformen durch alternatives Splicing entstehen, nimmt man an, dass es möglich ist durch die Produktion Isoform-spezifischer mAk funktionelle Subpopulationen von $\gamma\delta$ T-Zellen zu identifizieren.

4. PUBLIKATION

Developmental and Comparative Immunology 77 (2017) 229–240



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dci



Splenic $\gamma\delta$ T cell subsets can be separated by a novel mab specific for two CD45 isoforms[☆]



Daniela Huhle, Sieglinde Hirmer, Thomas W. Göbel*

Institute for Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2017

Accepted 21 August 2017

Available online 24 August 2017

Keywords:

Chicken

CD45

$\gamma\delta$ T cells

ABSTRACT

CD45 isoforms have been identified in a variety of different species and mab against various isoforms have been instrumental to define cellular subsets. In the process of generating novel mab against chicken $\gamma\delta$ T cells two mab with specificity for CD45 were identified and characterized. The analysis of the chicken CD45 genomic structure suggested three exons being involved in alternative splicing. We cloned and expressed the full length CD45 isoform and three shorter isoforms. While the 7D12 mab reacted with all of these isoforms, the 8B1 mab selectively reacted with two short isoforms lacking either exons 3 and 5 or exons 3, 5 and 6. As expected, the reactivity of 7D12 included all leukocyte subsets, also including thrombocytes. In contrast, the 8B1 mab only reacted with lymphocytes and monocytes. 8B1 expression was found on almost all blood $\alpha\beta$ T cells, while a $\gamma\delta$ T cell subset and virtually all B cells lacked 8B1 reactivity. The fraction of 8B1⁺ $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ cells was larger in splenocytes as compared to PBL and there was also a population of 8B1⁺ splenic B cells. CD3 stimulation of splenic T cells resulted in upregulation of the 8B1 antigen on all T cells. Three-color immunofluorescence revealed differences in CD28 expression between the 8B1⁺ and 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cell subsets with a higher CD28 expression level on 8B1 cells. The CD28 antigen was upregulated upon stimulation of the cells with IL-2 and IL-12. This novel mab will be a useful tool to further analyze chicken $\gamma\delta$ T cells in more detail.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The mammalian CD45 molecule is a transmembrane glycoprotein with intrinsic phosphotyrosine phosphatase activity. It is a member of the protein tyrosine phosphatase family of enzymes and is expressed on all nucleated cells of hematopoietic origin (Woodford-Thomas and Thomas, 1993). Its heavily glycosylated extracellular region is characterized by a variable N-terminal domain, due to alternative splicing of three exons, followed by a cysteine-rich domain and three fibronectin-type III repeats. While O-linked glycosylation occurs at the variable N-terminal domain, N-linked carbohydrate sites are found throughout the entire extracellular region. The intracellular portion, consisting of two tandem phosphotyrosine phosphatase domains, is linked to the extracellular region via a transmembrane domain (Hermiston et al., 2003).

CD45 molecules have not only been found in several species of mammals such as human (Hall et al., 1988) and mouse (Saga et al.,

1986). Genes coding for CD45 homologues have been identified in a variety of non-mammalian vertebrates, including chicken (Fang et al., 1994a), horned shark (*Heterodontus francisci*) (Okumura et al., 1996), hagfish (*Eptatretus stoutii*) (Nagata et al., 2002), lamprey (*Petromyzon marinus*) (Uinuk-ool et al., 2005), pufferfish (*Fugu rubripes*) (Díaz del Pozo et al., 2000), carp (*Cyprinus carpio*) (Fujiki et al., 2000) and catfish (*Ictalurus punctatus*) (Kountikov et al., 2010). Analysis of the various CD45 sequences revealed that the intracellular and transmembrane domains are the most conserved, while the extracellular domains share little sequence identity. However, the overall domain structure is conserved. The generation of the mab CL21 recognizing various high molecular weight determinants expressed on clawed frog (*Xenopus laevis*) leukocytes and exhibiting tyrosine specific phosphatase activity indicates the conservation of the CD45 structure and function for amphibians (Barritt and Turpen, 1995; Smith and Turpen, 1991).

The multiple isoforms of mammalian CD45 are generated by alternative splicing of exons 4, 5 and 6 (Michel Streuli et al., 1987; Trowbridge and Thomas, 1994). These are subject to differential expression among the various leukocyte subpopulations, dependent on cell type, activation state and differentiation (Hermiston

[☆] Supported by DFG Grant GO489/5-2.

* Corresponding author.

E-mail address: goebel@lmu.de (T.W. Göbel).

et al., 2003). For example, naïve peripheral T cells express a variety of larger isoforms, while these are down-regulated following activation and the smallest isoform is up-regulated (Deans et al., 1989; Hermiston et al., 2003; McNeill et al., 2004). In thymocytes splicing of specific exons changes during maturation. Immature double positive thymocytes rather express low molecular weight variants while single positive cells tend to express higher molecular weight variants (Fukuhara et al., 2002; Hermiston et al., 2003; McNeill et al., 2004). Extensive studies on various vertebrate species have shown a phylogenetic conservation of the alternative splicing properties of the N-terminal region of CD45. The amount of exons being alternatively spliced, however, varies strongly. For example, in chickens and horned shark three alternatively spliced exons have been found (Okumura et al., 1996), while a total of 18 alternatively spliced exons have been described for the catfish (Kountikov et al., 2010).

The chicken homologue of mammalian CD45 is expressed on all leukocytes. It is not present on erythroid cells, which are nucleated in the chicken (Paramithiotis et al., 1991). With lower expression levels than on lymphocytes, the CD45 molecule is also expressed on chicken thrombocytes (Viertlboeck and Göbel, 2007). Immunoprecipitation studies described distinct molecular mass variants of this molecule in various organs. Precipitates generated from bursa of fabricius derived B-cells express a higher molecular mass variant (215 kDa) than thymocytes, which predominantly express lower molecular mass variants (Paramithiotis et al., 1991). Immunoprecipitation and immunoblotting studies have also shown that splenocytes and PBL express multiple molecular weight variants (Houssaint et al., 1987; Paramithiotis et al., 1991).

Chicken CD45 exhibits intrinsic phosphotyrosine phosphatase activity, which was demonstrated using the specific mab LT40 to deplete all PTPase activity from membrane lysates of thymocytes (Paramithiotis et al., 1991). It could also be shown that the molecule is capable of dephosphorylating the protein tyrosine kinases c-Src and v-Src and elevate the kinase activity of c-Src (Fang et al., 1994b).

Sequence analysis of mammalian and chicken CD45 revealed the conservation of the overall domain structure (Okumura et al., 1996). The extracellular region of chicken CD45 also consists of three fibronectin type III repeats, a cysteine-rich region and a variable N-terminal domain containing potential N- and O-linked carbohydrate sites. Though the sequence identity of the extracellular regions is low, the transmembrane and cytoplasmic domains are highly conserved, with humans and chickens sharing 84% homology in the membrane-proximal PTPase domain (Okumura et al., 1996).

In this paper we report on two novel mabs 7D12 and 8B1 recognizing either all CD45 isoforms or the two short isoforms of the CD45 molecule in the chicken (CD45₁₂₄₇ and CD45₁₂₄₆₇). Using flow cytometric analysis, we have studied the 8B1 antigen expression on various organs and expression was detected on subsets of lymphocytes and monocytes. 8B1 staining was positive for almost all $\alpha\beta$ T cells, a subset of $\gamma\delta$ T cells and most B cells were negative for staining, except for a subset present in the spleen. Expression was elevated on all T cells following stimulation of splenocytes with CD3. This novel mab will be helpful to further define different chicken T cell subsets, in particular for $\gamma\delta$ T cells.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Fertilized eggs of the chicken line M11 (B²/B²) were kindly provided by S. Weigend (Mariensee, Germany). The birds were hatched and maintained at the Institute for Animal Physiology, University of Munich (Munich, Germany) under conventional

conditions. Organs of the animals were taken for experiments at ages 4–16 weeks. Mice of the inbred strain Balb/c were purchased from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) and maintained at the institute.

2.2. Cell preparation

Single cell suspensions from spleen and bursa were obtained by passing them through a stainless steel mesh and lymphocytes were gained by density centrifugation using Biocoll Separating Solution (Biochrom GmbH, Berlin, Germany). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from heparinized blood by density centrifugation on Biocoll Separating Solution and peripheral blood lymphocytes (PBL) were prepared by slow-speed centrifugation (Viertlboeck and Göbel, 2007). Monocyte-derived macrophages were gained by in vitro culture of PBMC in RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 8% foetal bovine serum (FBS)(Biochrom GmbH) and 2% chicken serum (Life Technologies) for 48 h at 40 °C and 5% CO₂ (Turowski et al., 2016).

2.3. Cell culture and cell stimulation

Splenocytes used for immunization, subsequent screening of hybridoma supernatants and cell proliferation assays were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS and 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH) at 40 °C and 5% CO₂. Cells were cultivated in 96-well flat bottom plates at a density of 1×10^6 /well and activated using a combination of chicken IL-2 and IL-12. Cytokines were produced as described before (Fenzl et al., 2017). Shortly, recombinant IL-2 was expressed in a prokaryotic expression system, transforming the E. coli strain M15pREP4 with a construct containing His-tagged chicken IL-2. The His-tagged cytokines were then purified using nickel-chelate affinity chromatography. Recombinant chicken IL-12 was produced as previously described (Degen et al., 2004; Fenzl et al., 2017). The splenocytes used for immunization and subsequent screening of hybridoma supernatants were cultured for one to two weeks before harvesting and for 96 h when used for the cell proliferation assay.

2.4. Generation of specific monoclonal antibodies, cell staining and analysis

The two mab described (7D12 and 8B1) were generated by immunizing a Balb/c mouse with 1×10^7 activated splenocytes on days 0, 3 and 9 and the fusion was performed on day 11 according to standard procedures using the myeloma cell line Ag8.653. Hybridoma supernatants were screened on activated splenocytes and only those that reacted positively were selected for further analysis. Subsequent studies were conducted with the supernatants of the mab 7D12 and 8B1.

Staining of cells for flow cytometry was carried out according to standard procedures. Single-cell staining was performed using the mab 7D12 (mouse IgG1) or the mab 8B1 (mouse IgM) followed by either gt- α -mouse Ig-human ads-AF647 or gt- α -mouse IgG1-FITC for the mab 7D12 and gt- α -mouse IgM-FITC for the mab 8B1. The following monoclonal antibodies used for multi-color immunofluorescence analysis were specific for: CD3 (CT3) (Chen et al., 1986), $\gamma\delta$ T cells (TCR1) (Sowder, 1988), $\alpha\beta$ 1 T cells (TCR2) (Cihak et al., 1988), $\alpha\beta$ 2 T cells (TCR3) (Chen et al., 1989), Bu1 (AV20) (Rothwell et al., 1996), CD8 α (3–298, mouse IgG2b) (Luhtala et al., 1997), CD4 (CT4) (Chan et al., 1988), monocytes and macrophages (KUL01) (Mast et al., 1998), CD28 (2–4) (Vainio et al., 1991), CLEC-2 (8G8, mouse IgG2a) (Neulen and Göbel, 2012), CD45 (16–6, mouse IgG2a) (Viertlboeck and Göbel, 2007). All mab were IgG1 isotypes, except where indicated. Conjugated secondary antibodies

were purchased from SBA, Birmingham, AL, USA. For double immunofluorescence analysis cells were first treated with a combination of mab and then reacted with secondary reagents, depending on the nature of the primary reagent. Three-color analysis was performed by treating the cells with a combination of mab 8B1 and TCR1, followed by a α -mouse Ig conjugated with APC or PE. Subsequent blocking with normal mouse serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was followed by mouse- α -chicken-CD28-FITC. For viability staining either 7-AAD (7-aminoactinomycin D, Sigma-Aldrich) or Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience GmbH, Frankfurt am Main, Germany) was used and appropriate isotype matched controls were applied for each staining. Flow cytometric analyses were performed on FACS-CantoII (BD, Heidelberg, Germany) using the BD FACS DIVA v6.1.3 software.

2.5. Cell proliferation assay

To evaluate the expression of the CD45 isoforms detected by the mab 8B1 on different activated spleen-derived lymphocyte subpopulations a 96-well flat bottom cell culture plate was coated with 10 μ g/ml mouse- α -ch-CD3 (CT3 clone). Splenocytes were labeled with eFluor670 Proliferation Dye (eBioscience GmbH) according to the manufacturer's protocol and after thoroughly washing the plate with PBS the cells were added to the plate at a concentration of 1×10^6 cells/well and cultured for 72 h (40 °C, 5% CO₂). Proliferation of the cells was determined by analysis of eFluor670 Proliferation Dye dilution and activated cells were examined for the CD45 isoform expression by FACS analysis.

2.6. Cloning procedures and transfection

In order to express the CD45 extracellular and transmembrane domains in conjunction with the chicken cytoplasmic CD3 ζ domain to allow surface expression without the need to clone the entire CD45 cytoplasmic domain, we devised the following cloning strategy. The vector pSBbi-GP (Kowarz et al., 2015) that harbors a green fluorescence protein and a puromycin resistance gene was digested with the *Sfi*I restriction enzyme. Two fragments were generated by PCR: primers 2088 and 2089 (Table 1) were used to amplify the CD45 extracellular and transmembrane domains on cDNA of different sources including bursa, spleen, PBL and activated splenocytes; primers 2090 and 1990 were used to amplify the chicken cytoplasmic CD3 ζ region on a plasmid previously generated. By virtue of overlapping regions (Table 1) with the vector ends or alternatively overlapping regions of the primers 2089 and 2090, the digested vector together with the two gel extracted PCR fragments could be assembled using Gibson assembly (New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany). All constructs were verified by sequencing (GATC, Konstanz, Germany). The expression constructs were used to stably transfect human embryonic kidney (HEK) 293 cells. For this purpose Metafectene transfection reagent (Biontex Laboratories GmbH, Munich, Germany) was applied

according to the manufacturer's instructions and the CD45 CD3 ζ encoding expression constructs were co-transfected with a transposase encoding vector at concentrations with a ratio of 20:1. After incubation of the cells for 24 h in RPMI 1640 at 37 °C and 5% CO₂ in a 24-well plate, the HEK cells were harvested, plated on a 96-well flat bottom plate and kept for 2 weeks in selection medium containing RPMI1640 supplemented with 10%FBS and 1 μ g/ml Puromycin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Subsequent flow cytometric analysis was performed to confirm cell surface expression of the extracellular CD45 domain on the grown single colonies.

2.7. PCR analysis

Total RNA of chicken thymus, PBL, bursa and spleen was isolated using Trizol reagent (Peqlab, Erlangen, Germany). RNA was reverse transcribed into cDNA using the ThermoScript™ RT-PCR kit (Life Technologies). To detect different CD45 isoforms, PCR was performed using OneTaq® DNA Polymerase (New England BioLabs) and primer 2124, specific for exon 2 and the reverse primer 2125, specific for exon 7. As controls, the expression vectors containing the different isoforms of chicken CD45 (CD45¹²⁴⁷, CD45^{1246/7}, CD45^{1234/6/7}, CD45^{1234/5/6/7}) were also included. PCR was performed as follows: initial denaturation for 2 min at 95 °C, followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, 55,8 °C for 30 s and 72 °C for 25 s. Final extension was executed at 72 °C for 5 min. PCR products were electrophoresed on a 2,5% metaphor agarose gel in 1xTBE buffer at 80 V for 3 h and visualized using SERVA DNA Stain Clear G (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) and an Image Quant 300 Imager (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

3. Results

3.1. Generation of 7D12 and 8B1 mab

In an attempt to generate novel mab against chicken $\gamma\delta$ T cells we immunized mice with in vitro expanded splenocytes that were cultured for one to two weeks in the presence of IL-2 and IL-12. This cytokine combination leads to a massive selective expansion of $\gamma\delta$ T cells (unpublished observation). After repeated immunizations, mab were generated and tested on primary chicken cells. One group of mab that included the 7D12 mab showed a staining pattern characteristic of CD45. In PBL, spleen and bursa (Fig. 1A) it virtually stained all leukocytes. PBMC were further divided by size and granularity into lymphocytes, monocytes and thrombocytes (Fig. 1B). Virtually all of these cell populations expressed CD45, however, a lymphocyte subpopulation as well as all thrombocytes at lower surface densities (Fig. 1B). This led us to conclude that 7D12 may represent a CD45 specific mab. The 8B1 mab also originated from the same fusion, but was not identified as CD45 specific by its staining features but rather by its reactivity with CD45 transfectants (see below).

Table 1
Sequences of oligonucleotides used.

Number	Orientation ^a	Sequence ^b	Specificity
2124	s	TTTGGCGTTGCCTTTCTGTG	chCD45 (Exon 2)
2125	as	GGTCTCTCCGTTGTAGCAC	chCD45 (Exon 7)
2088	s	<u>CCAAGCTGGCCTCTGATGTTTTGTGCGCTTAAACTCTT</u>	vector-chCD45
2089	as	<u>CTGGCTAAGCTTAGCTTTatagattttatagacagaaccaacag</u>	chCD45tm-chCD3 ζ
1990	As	<u>tcccaagcttgccctITAGCGGGCCGCGCAGG</u>	chCD3 ζ -vector

^a Orientation: s = sense, as = antisense.

^b Letters in lower case indicate specificity to chCD3 ζ . Underlined sequences reveal overlapping sites with the vector.

232

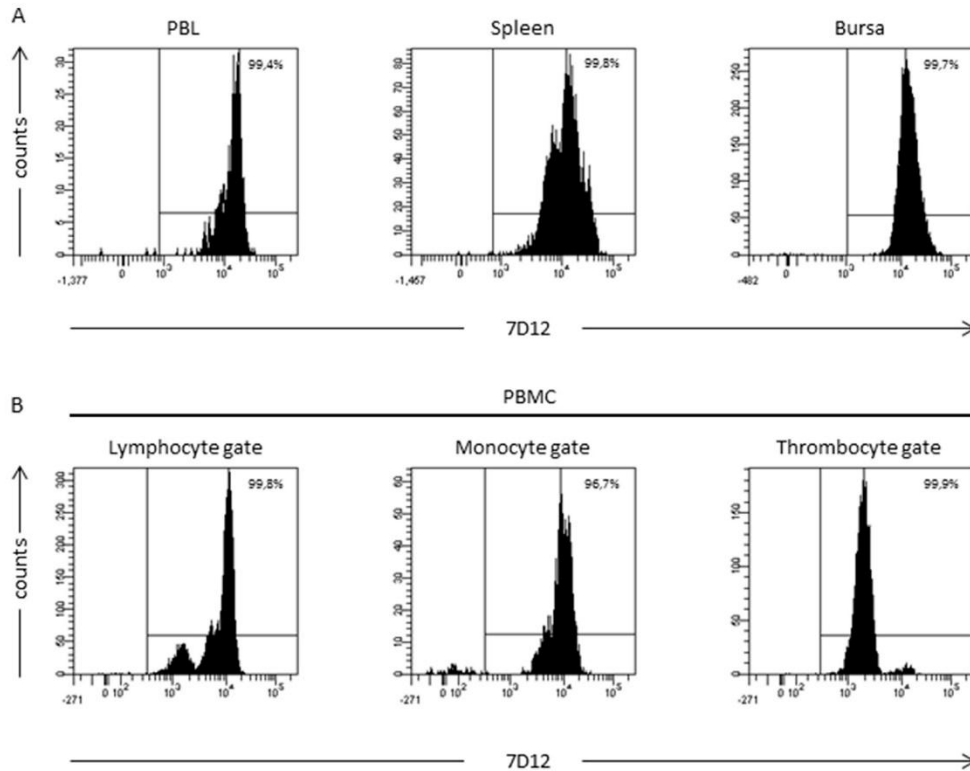
D. Huhle et al. / *Developmental and Comparative Immunology* 77 (2017) 229–240

Fig. 1. 7D12 expression on primary chicken cells. (A) Staining of leukocytes derived from blood (PBL), spleen and bursa and (B) staining of peripheral blood mononuclear cell subpopulations. Different leukocyte populations were gated by forward and side scatter features. The markers were set according to an isotype matched negative control. Numbers indicate percentage of positive cells.

3.2. Chicken CD45 is alternatively spliced to generate at least four distinct isoforms

In order to prove that the 7D12 mab reacts with chicken CD45 we next wanted to clone the corresponding gene and express it on HEK 293 cells. For this purpose, we developed a cloning strategy to express the extracellular and transmembrane CD45 domains together with a cytoplasmic CD3 ζ domain. This strategy allowed reliable cell surface expression of CD45 on transfected cells without the need to clone the entire intracellular CD45 domain.

During initial experiments to test the cloning strategy we not only cloned full length CD45 sequences but also shorter forms that may have been generated by alternative splicing of some of the first CD45 exons as it is well known for CD45. We therefore examined the chicken genomic CD45 sequence located on chicken chromosome 8 and focused on the exons that encode the region between the signal peptide and the beginning of the fibronectin type III domains (Fig. 2). The chicken CD45 gene consists of a total of 32 exons. Exon 1 encodes the 5' untranslated region, exon 2 the signal peptide, Exons 3 to 6 resemble the region, where alternative splicing is found in mammalian species. Exon 7 and part of exon 8 encode a short spacer region and exons 8 to 14 encode the fibronectin domains. The remaining exons (exons 15 to 32) encode the transmembrane and cytoplasmic domains.

Fig. 2B shows the different splice variants that we isolated and

sequenced. In total, we have identified four distinct CD45 isoforms: the full length CD45 with all exons present, a variant lacking exon 5, a variant lacking exons 3 and 5 and an isoform lacking exons 3, 5 and 6. Several individual PCR reactions on different tissues including bursa, spleen, PBL and activated splenocytes repeatedly resulted in these four different isoforms. Interestingly, the exon 4, encoding only seven amino acids, was present in all sequences and may therefore represent a fixed exon.

To further investigate the existence of additional CD45 splice variants, primers specific for exons 2 and 7 were used to amplify the region containing the alternatively spliced exons. The PCR results of various tissues coincide with the interpretation that there are four major CD45 isoforms (Fig. 2C), including a full length form that is the predominant isoform present in bursa and three shorter variants that are found in peripheral tissues and the thymus (Fig. 2C). Taken together, as in other species, chicken CD45 has the propensity to form several distinct isoforms as the result of alternative splicing.

The 7D12 mab reacts with all CD45 isoforms whereas the 8B1 mab specifically recognizes two shorter CD45 isoforms that are expressed by leukocyte subsets.

The four CD45 variants were next transfected into HEK 293 cells to establish four distinct cell lines expressing the different CD45 isoforms. All of the mab initially generated against the chicken $\gamma\delta$ T cells were screened for reactivity on these four cell lines. The

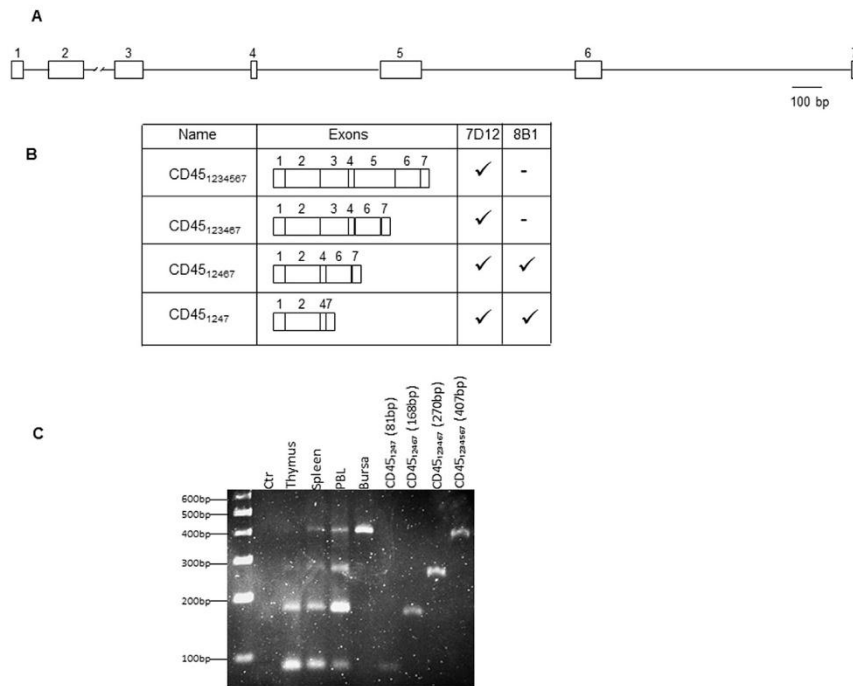


Fig. 2. CD45 genomic organization and splice variants. (A) Genomic organization of the first seven exons of CD45 according to *Gallus gallus* 5.0 assembly. Exon 1 encodes the 5' untranslated region, exon 2 the signal peptide, exons 3, 5 and 6 the alternatively spliced exons, exon 4 encodes seven amino acids which are found in all sequences and exon 7 encodes a spacer region with an invariant cysteine residue. Figure drawn to scale, note the break between exons 2 and 3 representing a long intron not drawn to scale. (B) Schematic representation of the different splice variants and their reactivity with the mab 7D12 and 8B1, respectively, where - indicates lack of binding. (C) PCR with specific primers for exons 2 and 7 on cDNA of thymus, spleen, PBL and bursa (lanes 2–5). The expression vectors containing the four cloned CD45 isoforms were included as controls (lanes 6–9).

transfectants were generated using a vector that also expressed a green fluorescence protein under a specific promoter. Therefore, the GFP fluorescence served as an internal transfection control that revealed intense GFP fluorescence in nearly all cells. (Fig. 3). Mock transfected cells were not reactive with the mab (data not shown). As a positive control, the previously established CD45 specific mab 16–6 was employed. The 16–6 and 7D12 mab showed a similar staining pattern with all CD45 variants (Fig. 3), however, the staining intensity was higher for 16–6 as compared to 7D12. There was one additional mab 8B1, that was reactive with HEK 293 cells expressing either the shortest variant (CD45₁₂₄₇) or the variant lacking exons 3 and 5 (CD45₁₂₄₆₇). Whereas almost all cells expressing the shortest CD45 variant (CD45₁₂₄₇) reacted with 8B1, only about 70% of the cells expressing the longer CD45₁₂₄₆₇ isoform were stained with the 8B1 mab.

Having established the specificity of the 8B1 mab, we next wanted to characterize its tissue distribution in more detail. For this purpose, PBL, splenocytes and bursal cells were stained with the 8B1 mab. In contrast to the staining pattern observed for the 7D12 mab (Fig. 1), only subpopulations of PBL and splenocytes reacted with 8B1 (Fig. 4A). In bursal cell preparations there was only a small positive cell population of about 1.5%. When PBMC were gated according to forward and side scatter features into lymphocytes, thrombocytes and monocytes, the 8B1 mab reacted with subsets of lymphocytes and monocytes, but only with a small fraction of thrombocytes (Fig. 4B). Moreover, we found reactivity of turkey PBMC but not duck PBL with the 8B1 mab (data not shown). These

staining characteristics were distinct from those found for the 7D12 or 16–6 mab, which reacted with all leukocytes.

The short CD45 isoforms detected by the 8B1 mab are detectable on T cell subsets.

In order to further characterize the lymphocyte subsets reactive with the 8B1 mab, we employed double immunofluorescence staining. In PBL the small CD45 isoforms were virtually absent from all AV20⁺ B cells, while they were expressed on almost all $\alpha\beta$ T cells identified by the TCR2 and TCR3 mab (Fig. 5A). In contrast, the staining with TCR1 and 8B1 revealed two populations of $\gamma\delta$ T cells, an 8B1⁺ and an 8B1⁻ population, respectively. The 8B1 and CD3 staining confirmed this observation, since a fraction of the CD3⁺ cells lacked 8B1 expression (Fig. 5A). We consistently observed that the TCR1/CD3⁺ 8B1⁻ cells showed a reduced TCR surface expression as compared to the double positive population (Fig. 5A). In agreement with the results of TCR staining, virtually all CD4⁺ cells co-expressed 8B1, while a fraction of CD8⁺ cells lacked 8B1 expression.

We also employed the mab Kul01 and CLEC-2 as macrophage and thrombocyte specific markers in double staining with 8B1 on PBMC. Fig. 5B shows that thrombocytes lack expression of the smaller CD45 isoforms and that freshly prepared monocytes as well as in vitro cultured macrophages are 8B1⁺.

In splenocytes, there was a larger fraction of CD3⁺ 8B1⁻ cells. About one third of the splenic $\gamma\delta$ T cells lacked 8B1 expression and in contrast to PBL, there was also a small distinct 8B1⁻ $\alpha\beta$ T cell subset (Fig. 5C). Moreover, a small B cell population, as identified by the AV20 mab, was found to co-express the 8B1 antigen (Fig. 5C).

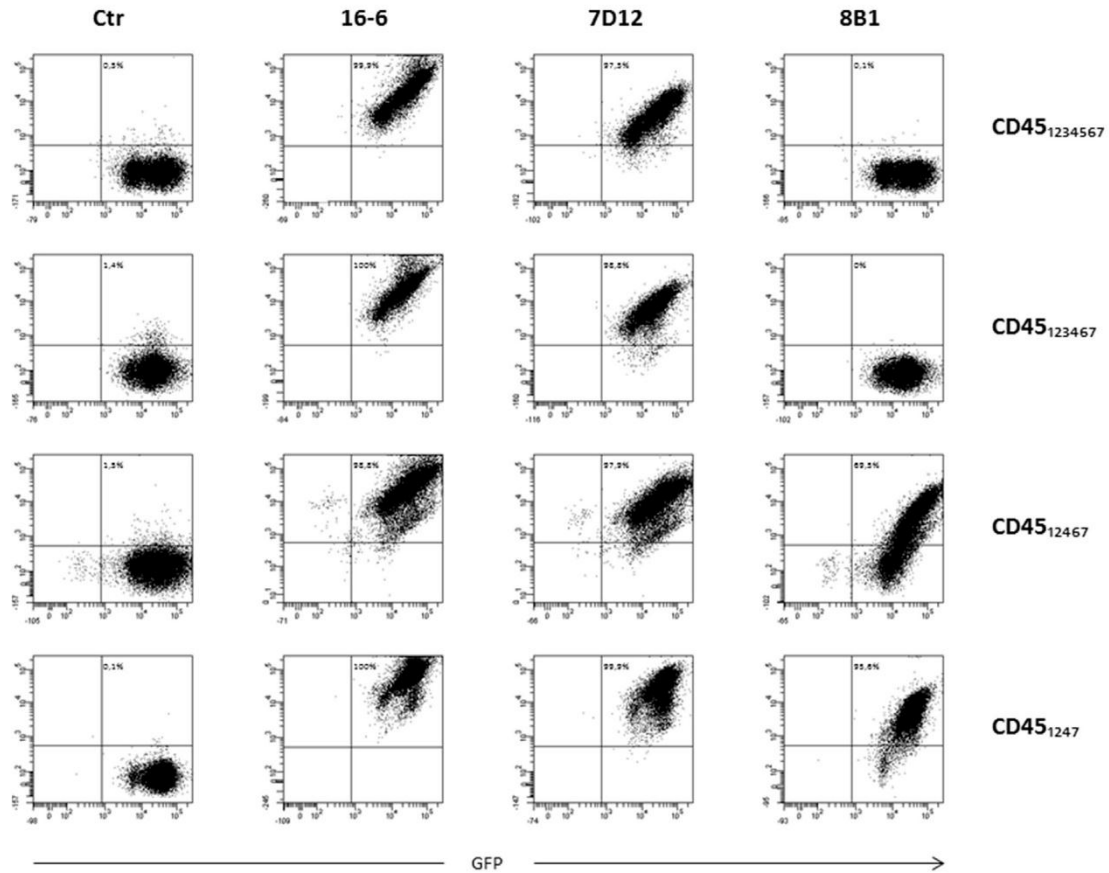


Fig. 3. 8B1 mab staining on stably transfected HEK 293 cell lines reveals that it recognizes two shorter CD45 isoforms. HEK 293 cells were stably transfected with expression constructs containing one of the four cloned isoforms of CD45. The CD45 constructs also accommodate a green fluorescent protein (GFP) under the influence of an independent promoter to audit transfection efficiency. Transfected cells were stained with mab generated against chicken $\gamma\delta$ T cells and analyzed in combination with GFP. The CD45 isoform expressed by the transfected cells is indicated at the right hand side of the figure. As a positive control, cells were stained with the CD45 specific mab 16-6 and a negative control was performed with an IgM mab of irrelevant specificity.

Since the mab were generated by immunization with *in vitro* expanded, stimulated cells, we next examined the 8B1 mab reactivity on splenocytes that were either unstimulated or stimulated for three days with anti-CD3 mab (Fig. 6). To specifically analyze proliferating cells, the splenocytes were labeled with a fluorescence tracing dye before stimulation. Unstimulated cells again showed a small 8B1⁻ $\alpha\beta$ T cell fraction and a larger 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cell subset (Fig. 6). Following 72 h cultivation on CD3 coated plates the majority of splenocytes showed reduced tracing dye levels as indicator of cell proliferation. These cells were virtually all 8B1⁻, thus indicating that T cell activation leads to alternative CD45 splicing (Fig. 6).

To further investigate the nature of the two $\gamma\delta$ T cell subpopulations identified by presence or absence of 8B1 reactivity, we performed three-color staining using an anti-CD28 mab. In both PBL and spleen, the 8B1⁺ $\gamma\delta$ T cells almost completely lacked CD28 expression. Most of the 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cells in PBL expressed high CD28 levels, whereas in splenocytes a fraction of these cells expressed low CD28 levels (Fig. 7A). Splenocytes were next cultured for four days in the presence of IL-2 and IL-12, a combination that

specifically induces proliferation of $\gamma\delta$ T cells. The frequency of both $\gamma\delta$ T cell subsets increased during the culture period. Upon stimulation, CD28 could be detected on 8B1⁺ cells and the CD28 levels on 8B1⁻ cells increased as compared to unstimulated cells.

4. Discussion

Vertebrates can be divided into $\gamma\delta$ low species (including humans and mice) and $\gamma\delta$ high species (including cattle, sheep, rabbits, pigs and chickens) (Hein and Dudler, 1993; Su et al., 1999; Takamatsu et al., 2006). Chickens possess a high frequency of $\gamma\delta$ T cells, with the peripheral blood lymphocytes comprising up to 50% $\gamma\delta$ T cells (Arstila and Lassila, 1993). Chicken $\gamma\delta$ T cells are still a poorly characterized cell population regarding not only their function, but also phenotype and subset differentiation.

It has not been possible to establish a universally applicable system to classify subpopulations of $\gamma\delta$ T cells in various species. In humans two major $\gamma\delta$ T cell subsets have been defined according to their differential expression of either V δ 1 or V δ 2 TCR (Kalyan and

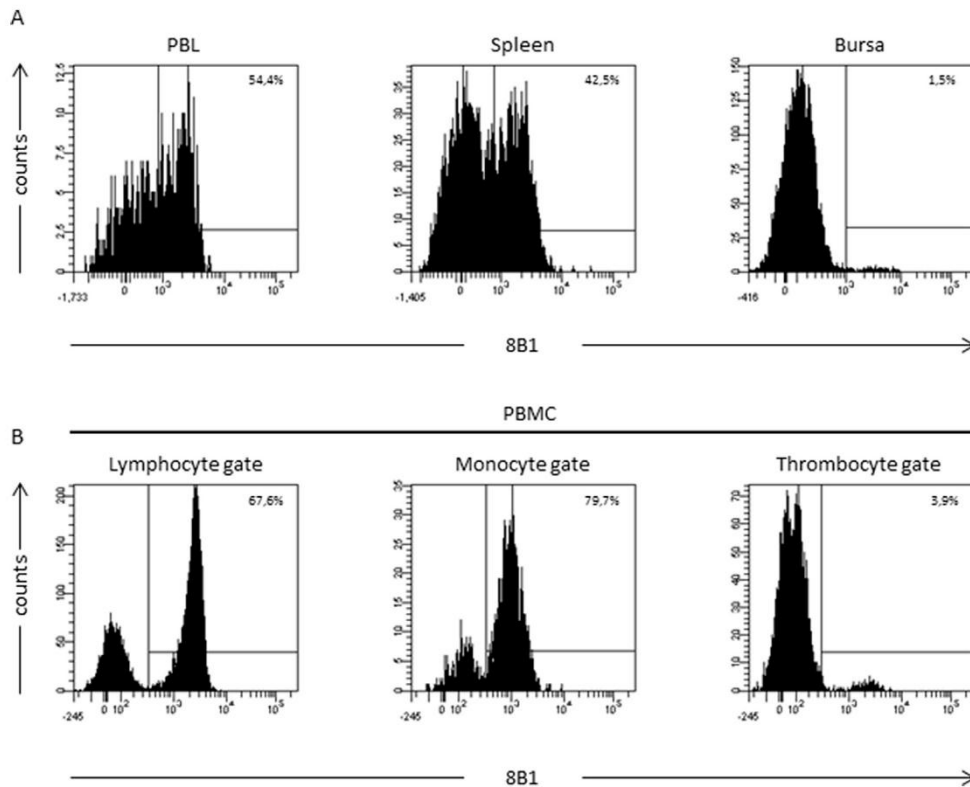


Fig. 4. 8B1 expression on chicken leukocytes. (A) Single cell suspensions of tissues indicated were stained with 8B1 and markers set according to an isotype matched negative control. (B) PBMC were gated into lymphocytes, monocytes and thrombocytes by size and granularity and analyzed for 8B1 expression.

Kabelitz, 2013). Tissue associated $\gamma\delta$ T cells mainly express V δ 1 TCR while peripheral blood $\gamma\delta$ T cells mainly express V δ 2. In mice $\gamma\delta$ T cells preferentially reside in epithelial tissues, with restricted usage of V genes. For example, $\gamma\delta$ T cells which appear in the epithelium of uterus, vagina and tongue of mice predominantly possess the V γ 6V δ 1 TCR (Itohara et al., 1990) while V γ 5V δ 1 bearing T cells appear in the skin (Tigelaar and Lewis, 1995). V γ or V δ specific mab have not been developed in the chicken. To date only few cell surface markers have been identified to classify subpopulations of $\gamma\delta$ T cells. These include CD8, CD25, CD28, CD5 and CD6. It has been shown that CD8 is a useful marker in chickens to identify subpopulations of $\gamma\delta$ T cells (Tregaskes et al., 1995) (Berndt et al., 2006). On the basis of CD8 expression $\gamma\delta$ T cells can be divided into CD8 $\alpha\alpha'$ high (CD8 $\alpha\alpha'$ and CD8 $\alpha\beta'$), CD8 $\alpha\alpha'$ dim and CD8 α expressing T cells (Berndt et al., 2006). CD25 has been established as being a potent activation marker also for $\gamma\delta$ T cells (Braukmann et al., 2015). Another marker for studying subsets of chicken $\gamma\delta$ T cells is the costimulatory molecule CD28 (Koskela et al., 1998), present on the majority of $\alpha\beta$ T cells and all thymic $\gamma\delta$ T cells but absent on most peripheral $\gamma\delta$ T cells (Vainio et al., 1991). CD6 is a molecule absent from most chicken $\gamma\delta$ T cells, except a CD8 α' $\gamma\delta$ T cell subset in the spleen (Göbel et al., 1996). CD5 is present at low or intermediate levels on chicken $\gamma\delta$ T cells depending on their tissue location (Koskinen et al., 1998). Taken together, it is of great interest to find more markers of $\gamma\delta$ T cells to further characterize special subsets.

CD45, a widely studied molecule in mice and humans has also been found in chickens (Houssaint et al., 1987) (Fang et al., 1994a). In mammals, different isoforms of the molecule are generated by alternative splicing of three exons located at the N-terminal of the extracellular domain. These are subject to differential expression dependent on leukocyte subpopulations, activation state and differentiation (Hermiston et al., 2003). It has been shown that the corresponding N-terminal domain of the extracellular region of the chicken CD45 sequence is also subject to alternative splicing of three exons (Fang et al., 1994a; Okumura et al., 1996). Interestingly, the first exon being alternatively spliced is separated by the remaining two by a small exon not being alternatively spliced (Fang et al., 1994a). This phenomenon has also been reported for the catfish, where the first alternatively spliced exon is separated from the remaining 17 by an exon which is not alternatively spliced (Kountikov et al., 2005). Previously, the presence of five different splice variants of chicken CD45 have been found using the chicken DT40 cell line (Fang et al., 1994a). In our study we identified four variants of chicken CD45, expressed in lymphocytes of various organs. We do not exclude the possibility of additional splice variants as demonstrated before, however, the PCR results suggest that the four variants identified here are the major forms found in bursa, spleen, thymus and blood. Regardless, our finding of an exon not being alternatively spliced (exon 4) is consistent with previous findings (Fang et al., 1994a).

236

D. Hühle et al. / *Developmental and Comparative Immunology* 77 (2017) 229–240

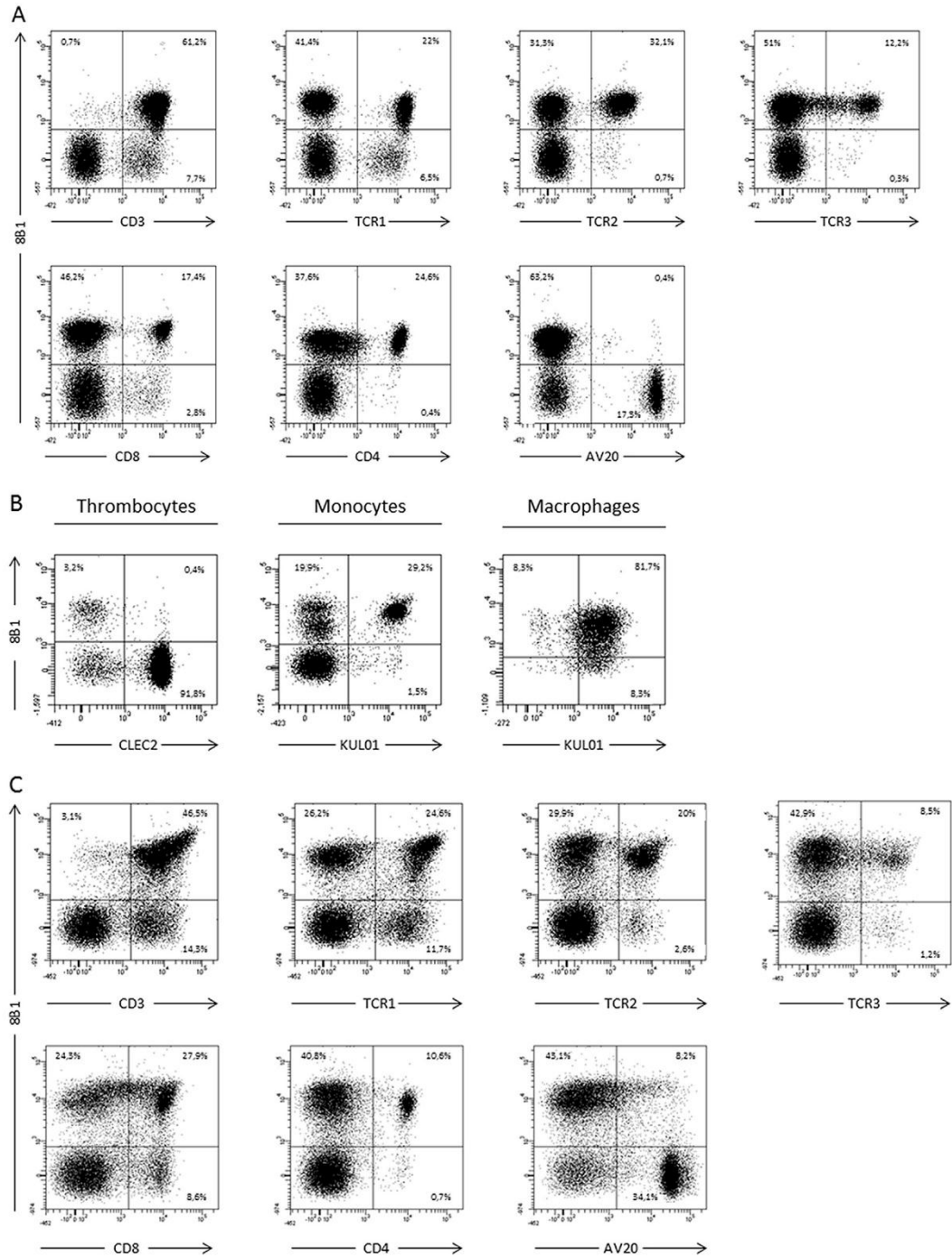


Fig. 5. Expression of small CD45 isoforms on various leukocyte subsets. (A) PBL were stained with mAb 8B1 in combination with various lymphocyte markers as indicated. (B) PBMC were stained with 8B1 and markers specific for thrombocytes or monocytes/macrophages and gated according to size and granularity. For macrophage staining cells were cultured 48 h before staining. (C) Double staining of splenocytes with the markers indicated. Markers were set based on staining with isotype matched controls and numbers indicate percentages. One representative out of three experiments is shown.

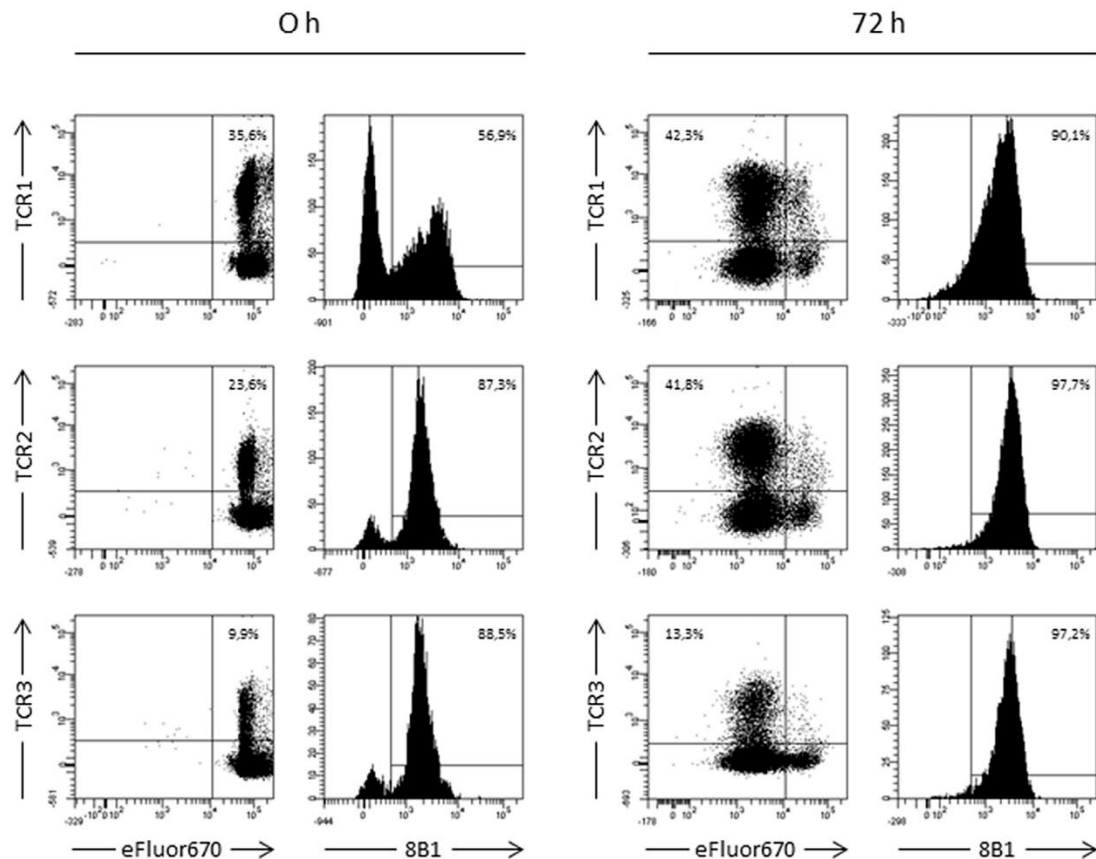


Fig. 6. T cell activation leads to alternative CD45 splicing. Splenocytes were labeled with a fluorescent dye (eFluor670) to detect proliferation of activated T cells. The cells were stained with mab specific for the TCR as indicated and analyzed in combination with eFluor670. 8B1 expression was analyzed on unstimulated T cells (left panel) and T cells stimulated for 72 h (right panel). The 8B1 expression upon activation was analyzed by gating on cells with reduced eFluor670 levels (right panel).

Chicken CD45 is found on all leukocytes but not erythroid cells (Paramithiotis et al., 1991) and also on thrombocytes with lower expression levels (Viertlboeck and Göbel, 2007). Isoforms of chicken CD45 are expressed differentially on leukocytes of various organs. For instance, bursa derived B cells express the higher 215 kDa variant of CD45 compared to thymocytes expressing lower molecular mass variants (Paramithiotis et al., 1991). To date, a variety of antibodies have been generated that recognize chicken CD45, including the mab CL-1 (Houssaint et al., 1987), L17 (Pink and Rijnbeek, 1983), LT40 (Paramithiotis et al., 1991), HIS-C7 (Jeurissen et al., 1988) and 16-6 (Viertlboeck and Göbel, 2007). However, all of these antibodies probably recognize an epitope common to all CD45 isoforms. One mab, CLA-1 (Chen and Cooper, 1987), has been found to react with smaller isoforms of chicken CD45, with limited expression on leukocyte subsets, as shown by immunoprecipitation studies.

We now report on the mab 8B1 recognizing two distinct small isoforms, CD45₁₂₄₇ and CD45_{1246/7}, thus recognizing different subpopulations of lymphocytes, as well as monocytes and macrophages. In contrast to the previous studies, we have verified the specificity by transfection studies with the various CD45 isoforms.

Single color staining suggested expression of these isoforms on some thrombocytes, however, this could not be demonstrated in double staining analysis using the thrombocyte specific mab 8G8. Since thrombocytes have the propensity to cluster to other cells it is likely that the small 8B1⁺ thrombocyte population represented a false positive staining. The mab 8B1 is positive for staining on a small subset of bursal cells (1.5%), a slightly larger subset of AV20⁺ cells in spleen (8.2%), but negative on AV20⁺ cells in PBL. Interestingly, the isoforms detected by this antibody are expressed by almost all $\alpha\beta$ T cells in spleen and PBL, with a slightly larger population of cells in spleen being 8B1⁺ than in PBL. After stimulation of splenocytes with immobilized anti CD3 mab, virtually all TCR2⁺ cells were positive for 8B1. The finding for TCR3⁺ cells was very similar. For $\gamma\delta$ T cells, we have demonstrated the ability of mab 8B1 to divide these cells in spleen and PBL into a larger 8B1⁺ and a smaller 8B1⁻ subpopulation. Additionally, the 8B1 expression on $\gamma\delta$ T cells was upregulated following stimulation of splenocytes with anti CD3 mab. These findings suggest that the CD45 isoforms detected by mab 8B1 are upregulated on activated T cells. Interestingly 8B1⁺ $\gamma\delta$ T cells demonstrate higher densities of the TCR1 receptor present on the cell surface.

238

D. Huhle et al. / *Developmental and Comparative Immunology* 77 (2017) 229–240

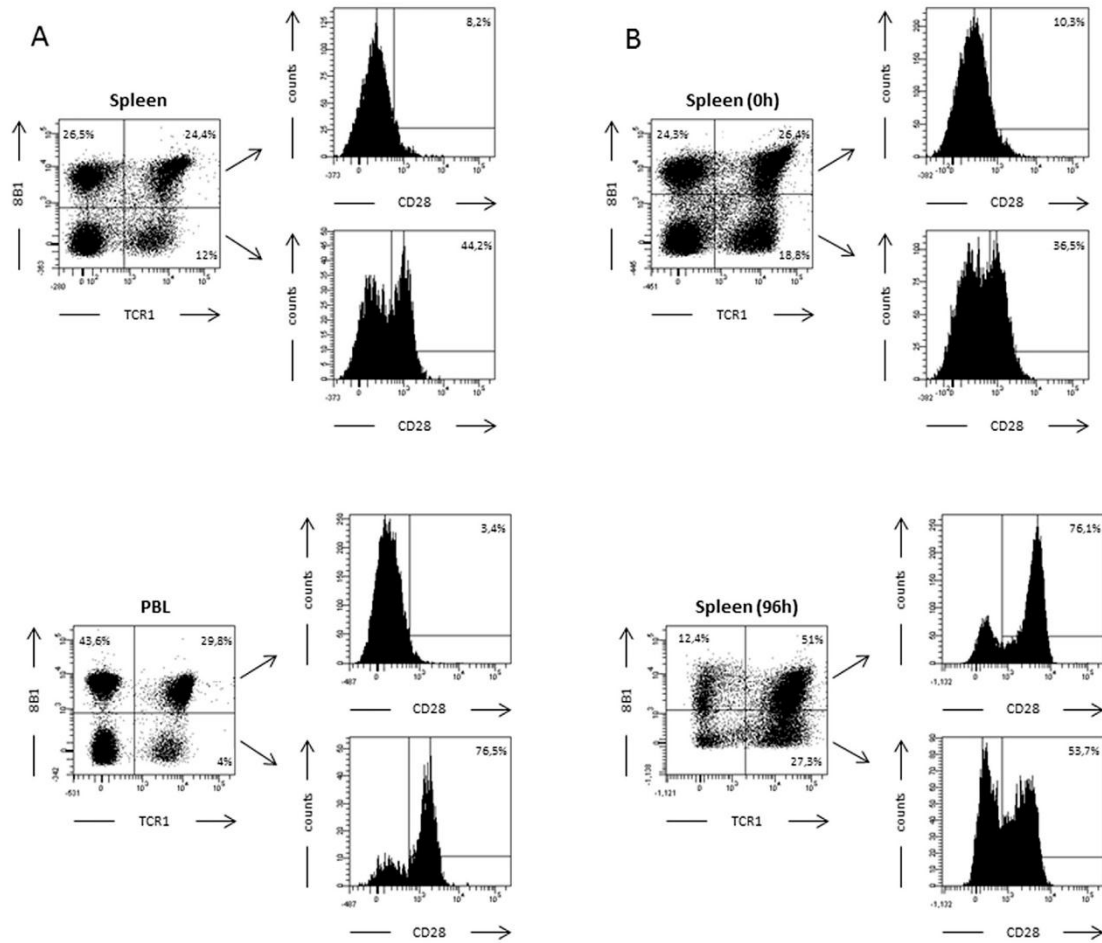


Fig. 7. CD28 expression on 8B1⁺ and 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cells. (A) Three-color staining of splenocytes and PBL with a combination of mab 8B1, TCR1 and 2–4. 8B1 and 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cells were examined for the expression of CD28. (B) CD28 expression was examined on unstimulated and IL-2, IL-12 stimulated (96 h) splenocytes. Arrows indicate which population is analyzed on the histogram. One of three independent experiments is depicted.

To further characterize the 8B1⁺ and 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cells in spleen and PBL we analyzed their expression of CD28 on unstimulated and in vitro stimulated cells. Our studies have shown that subpopulations of $\gamma\delta$ T cells in spleen and PBL express the CD28 molecule and in spleen a higher frequency of $\gamma\delta$ T cells co-express the CD28 molecule than in PBL. Previously, CD28 expression could not be detected on freshly prepared $\gamma\delta$ T cells in chicken spleen and PBL (Vainio et al., 1991). This could be due to a different chicken strain used. Our findings in PBL were consistent with those found by others (Koskela et al., 1998). After IL-2, IL-12 stimulation of splenocytes for 96 h the frequency of CD28 expressing $\gamma\delta$ T cells increased to about 68%. Moreover, three-color staining analysis of 8B1⁺ $\gamma\delta$ T cells in unstimulated splenocytes and PBL showed, that only a small subpopulation of the cells express the CD28 molecule (9 ± 1% in spleen and 4 ± 1% in PBL), while a large subpopulation of 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cells express CD28 (44 ± 4% in spleen and 76 ± 1% in PBL). CD28 expression is drastically increased after activation of

splenocytes for 96 h, on both the 8B1 and 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cells, although the frequency of 8B1⁺ $\gamma\delta$ T cells expressing CD28 is much greater (76.1%) than the 8B1 T cells (53.7%).

Vertebrates share low protein sequence identity in the extracellular domain of CD45 compared to the intracellular domain. Therefore there is a possibility that interactions with the ligands of CD45 are rather mediated through the carbohydrate residues (Okumura et al., 1996; Thomas, 1989). CD45 glycosylation is due to N-linked glycosylation throughout the entire extracellular domain and O-linked glycosylation throughout the region encoding the variably spliced exons. The pattern of this glycosylation depends on alternative splicing but also on the cell type, its developmental and activation state and it is therefore suggested that different glycosylation patterns are functionally important (Hermiston et al., 2003). We believe that the mab 8B1 rather binds an epitope on the carbohydrate groups. As our mab 8B1 is an IgM antibody, the isotype primarily produced during the immune response to

saccharides, it probably recognizes an epitope of these carbohydrate groups (Heimburg-Molinaro and Rittenhouse-Olson, 2009). Because this antibody detects two different isoforms of CD45 it is possible that it detects a specific glycosylation pattern only present on these isoforms due to the splicing of specific exons.

To our knowledge, the 8B1 mab is the first mab to specifically detect these two CD45 splice variants in a non-mammalian species. The fact that this mab stains only a subset of leukocytes reemphasizes the importance of CD45 splicing for lymphocyte function. With regard to $\gamma\delta$ T cells, this novel mab will be helpful to analyze $\gamma\delta$ T cell subsets in more detail.

Acknowledgements

We thank Marie-Luise Neulen for the help with flow cytometric analyses.

References

- Arstila, T.P., Lassila, O., 1993. Androgen-induced expression of the peripheral blood gamma delta T cell population in the chicken. *J. Immunol.* 151, 6627–6633.
- Barritt, L.C., Turpen, J.B., 1995. Characterization of lineage restricted forms of a *Xenopus* CD45 homologue. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 525–536.
- Berndt, A., Pieper, J., Methner, U., 2006. Circulating $\gamma\delta$ T cells in response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure in chickens. *Inf. Immunol.* 74, 3967–3978.
- Braukmann, M., Methner, U., Berndt, A., 2015. Avian CD25+ gamma/delta ($\gamma\delta$) T cells after *Salmonella* exposure. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 168, 14–18.
- Chan, M.M., Chen, C.L., Ager, L.L., Cooper, M.D., 1988. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J. Immunol.* 140, 2133–2138.
- Chen, C.H., Cooper, M.D., 1987. Identification of cell surface molecules on chicken lymphocytes with monoclonal antibodies. In: Toivanen, A., Toivanen, P. (Eds.), *Avian Immunology: Basis and Practice* 1. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Chen, C.H., Sowder, J.T., Lahti, J.M., Cihak, J., Löscher, U., Cooper, M.D., 1989. TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2351–2355.
- Chen, C.L., Ager, L.L., Gartland, L., Cooper, M.D., 1986. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *J. Exp. Med.* 164, 375–380.
- Cihak, J., Ziegler-Heitbrock, H.W.L., Trainer, H., Merkenschlager, M., Löscher, U., 1988. Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. *Eur. J. Immunol.* 18, 533–538.
- Deans, J.P., Boyd, A.W., Pilarski, L.M., 1989. Transitions from high to low molecular weight isoforms of CD45 (T200) involve rapid activation of alternate mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R. *J. Immunol.* 143, 1233–1238.
- Degen, W.G.J., van Daal, N., van Zuilekom, H.L., Burnside, J., Schijns, V.E.J.C., 2004. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *J. Immunol.* 172, 4371–4380.
- Díaz del Pozo, E., Beverley, P.C.L., Timón, M., 2000. Genomic structure and sequence of the leukocyte common antigen (CD45) from the pufferfish *Fugu rubripes* and comparison with its mammalian homologue. *Immunogenet* 51, 838–846.
- Fang, K.S., Barker, K., Sudol, M., Hanafusa, H., 1994a. A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 269, 14056–14063.
- Fang, K.S., Sabe, H., Saito, H., Hanafusa, H., 1994b. Comparative study of three protein-tyrosine phosphatases. Chicken protein-tyrosine phosphatase lambda dephosphorylates c-Src tyrosine 527. *J. Biol. Chem.* 269, 20194–20200.
- Fenzl, L., Göbel, T.W., Neulen, M.-L., 2017. $\gamma\delta$ T cells represent a major spontaneously cytotoxic cell population in the chicken. *Dev. Comp. Immunol.* 73, 175–183.
- Fujiki, K., Shin, D.-H., Nakao, M., Yano, T., 2000. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leukocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor β , CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridisation. *Fish. Shellfish Immunol.* 10, 643–650.
- Fukuhara, K., Okumura, M., Shiono, H., Inoue, M., Kadota, Y., Miyoshi, S., Matsuda, H., 2002. A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus. *Hum. Immunol.* 63, 394–404.
- Göbel, T.W.F., Chen, C.-L.H., Cooper, M.D., 1996. Expression of an avian CD6 candidate is restricted to $\beta\delta$ T cells, splenic CD8+ $\gamma\delta$ T cells and embryonic natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 1743–1747.
- Hall, L.R., Streuli, M., Schlossman, S.F., Saito, H., 1988. Complete exon-intron organization of the human leukocyte common antigen (CD45) gene. *J. Immunol.* 141, 2781–2787.
- Heimburg-Molinaro, J., Rittenhouse-Olson, K., 2009. Development and characterization of antibodies to carbohydrate antigens. In: Packer, N.H., Karlsson, N.G. (Eds.), *Glycomics: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 341–357.
- Hein, W.R., Dudler, L., 1993. Divergent evolution of T cell repertoires: extensive diversity and developmentally regulated expression of the sheep gamma delta T cell receptor. *EMBO J.* 12, 715–724.
- Hermiston, M.L., Xu, Z., Weiss, A., 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Ann. Rev. Immunol.* 21, 107–137.
- Houssaint, E., Tobin, S., Cihak, J., Löscher, U., 1987. A chicken leukocyte common antigen: biochemical characterization and ontogenetic study. *Eur. J. Immunol.* 17, 287–290.
- Itohara, S., Farr, A.G., Lafaille, J.J., Bonneville, M., Takagaki, Y., Haas, W., Tonegawa, S., 1990. Homing of a [gamma][delta] thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 343, 754–757.
- Jeurissen, S.H.M., Janse, E.M., Ekino, S., Nieuwenhuis, P., Koch, G., De Boer, G.F., 1988. Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of Fabricius, and spleen of the chicken. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 19, 225–238.
- Kalyan, S., Kabelitz, D., 2013. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 21–29.
- Koskela, Arstila, Lassila, 1998. Costimulatory function of CD28 in avian $\gamma\delta$ T cells is evolutionarily conserved. *Scand. J. Immunol.* 48, 635–641.
- Koskinen, R., Göbel, T.W.F., Tregaskes, C.A., Young, J.R., Vainio, O., 1998. The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J. Immunol.* 160, 4943–4950.
- Kountikov, E., Nayak, D., Wilson, M., Miller, N.W., Bengtén, E., 2010. Expression of alternatively spliced CD45 isoforms by channel catfish clonal T and B cells is dependent on activation state of the cell and regulated by protein synthesis and degradation. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 1109–1118.
- Kountikov, E., Wilson, M., Miller, N., Clem, W., Bengtén, E., Quiniou, S., 2005. Genomic organization of the channel catfish CD45 functional gene and CD45 pseudogenes. *Immunogenet* 57, 374–383.
- Kowarz, E., Löscher, D., Marschalek, R., 2015. Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotech. J.* 10, 647–653.
- Luhatala, M., Lassila, O., Toivanen, P., Vainio, O., 1997. A novel peripheral CD4+CD8+ T cell population: inheritance of CD8 α expression on CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 189–193.
- Mast, J., Goddeeris, B.M., Peeters, K., Vandesande, F., Berghman, L.R., 1998. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 343–357.
- McNeill, L., Cassidy, R.L., Sarkardei, S., Cooper, J.C., Morgan, G., Alexander, D.R., 2004. CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol. Lett.* 92, 125–134.
- Michel Streuli, L.R.H., Yumiko, Saga, Stuart, F., Schlossman, Haruo, Saito, 1987. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J. Exp. Med.* 166, 1548–1566.
- Nagata, T., Suzuki, T., Ohta, Y., Flajnik, M.F., Kasahara, M., 2002. The leukocyte common antigen (CD45) of the Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*: implications for the primordial function of CD45. *Immunogenet* 54, 286–291.
- Neulen, M.-L., Göbel, T.W., 2012. Identification of a chicken CLEC-2 homologue, an activating C-type lectin expressed by thrombocytes. *Immunogenet* 64, 389–397.
- Okumura, M., Matthews, R.J., Robb, B., Litman, G.W., Bork, P., Thomas, M.L., 1996. Comparison of CD45 extracellular domain sequences from divergent vertebrate species suggests the conservation of three fibronectin type III domains. *J. Immunol.* 157, 1569–1575.
- Paramithiotis, E., Tkalec, L., Ratcliffe, M.J., 1991. High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes. *J. Immunol.* 147, 3710–3717.
- Pink, J.R., Rijnbeek, A.-M., 1983. Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. *Hybridoma* 2, 287–296.
- Rothwell, C.J., Vervelde, L., Davison, T.F., 1996. Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 55, 225–234.
- Saga, Y., Tung, J.S., Shen, F.W., Boyse, E.A., 1986. Sequences of Ly-5 cDNA: isoform-related diversity of Ly-5 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6940–6944.
- Smith, P.B., Turpen, J.B., 1991. Expression of a leukocyte-specific antigen during ontogeny in *Xenopus laevis*. *Dev. Immunol.* 1, 295–307.
- Sowder, J.T., 1988. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J. Exp. Med.* 167, 315–322.
- Su, C., Jakobsen, I., Gu, X., Nei, M., 1999. Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. *Immunogenet* 50, 301–308.
- Takamatsu, H.H., Denyer, M.S., Stirling, C., Cox, S., Aggarwal, N., Dash, P., Wileman, T.E., Barnett, P.V., 2006. Porcine $\gamma\delta$ T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 49–61.
- Thomas, M.L., 1989. The leukocyte common antigen family. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 339–369.
- Tigelaar, R.E., Lewis, J.M., 1995. Immunobiology of mouse dendritic epidermal T cells: a decade later, some answers, but still more questions. *J. Invest. Dermatol.* 105, 435–495.
- Tregaskes, C.A., Kong, F.K., Paramithiotis, E., Chen, C.L., Ratcliffe, M.J., Davison, T.F., Young, J.R., 1995. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol.* 154, 4485–4494.
- Trowbridge, I.S., Thomas, M.L., 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Ann. Rev. Immunol.* 12, 85–116.
- Turowski, V., Sperling, B., Hanczaruk, M.A., Göbel, T.W., Viertelboeck, B.C., 2016. Chicken TREM-B1, an inhibitory ig-like receptor expressed on chicken thrombocytes. *PLoS One* 11, e0151513.
- Uinuk-ool, T., Nikolaidis, N., Sato, A., Mayer, W.E., Klein, J., 2005. Organization, alternative splicing, polymorphism, and phylogenetic position of lamprey CD45

240

*D. Huhle et al. / Developmental and Comparative Immunology 77 (2017) 229–240*gene. *Immunogenet* 57, 607–617.Vainio, O., Riwar, B., Brown, M.H., Lassila, O., 1991. Characterization of the putative avian CD2 homologue. *J. Immunol.* 147, 1593–1599.

Viertlboeck, B.C., Göbel, T.W., 2007. Chicken thrombocytes express the CD51/CD61

integrin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 119, 137–141.Woodford-Thomas, T., Thomas, M.L., 1993. The leukocyte common antigen, CD45 and other protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells. *Sem. Cell Biol.* 4, 409–418.

5. DISKUSSION

Ein gut charakterisiertes Oberflächenmolekül, dessen Splicevarianten beim Säuger unterschiedlich auf kernhaltigen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert wird, ist die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass diese PTPase nicht nur zellartspezifisch exprimiert wird, sondern dass Zellen innerhalb einer Population anhand der exprimierten CD45 Splicevariante entsprechend ihres Aktivierungszustands und Differenzierungsgrads identifiziert werden können [8, 20, 21]. Das Pendant zum Säuger CD45 liegt beim Huhn auf Chromosom 8. Dieses Gen besteht aus 32 Exons, von denen Exon 1 den 5'untranslatierten Bereich kodiert und Exon 2 das Signalpeptid. Exons 3 bis 6 repräsentieren den Bereich, welcher im Säuger am alternativen Splicing beteiligt ist. Exon 7 und ein Teil des Exons 8 kodieren eine kurze Spacerregion und Exons 8 bis 14 kodieren die drei TypIII Fibronektin-Domänen. Die restlichen Exons kodieren die transmembranöse und die beiden zytoplasmatischen Domänen.

Beim Huhn wird der entsprechende N-terminale Bereich der Ektodomäne des CD45 Gens ebenso alternativ gespliced [80, 81]. Mittels PCR-Analyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beim Huhn ebenfalls drei Exons am Splicing beteiligt sind, wobei ein entscheidender Unterschied besteht. Das erste alternativ gesplicete Exon 3 wird durch das Exon 4, welches nicht alternativ gespliced wird, von den beiden weiteren, Exon 5 und 6, getrennt. Dies deckt sich mit einer früheren Studie [80]. Die PCR Ergebnisse zeigten auch, dass 4 Isoformen von CD45 in der Bursa Fabricii, Thymus, PBL und Milz dominieren. Exprimiert werden eine Form, die alle Exons enthält (CD45₁₂₃₄₅₆₇), eine Variante, bei der alle gespliceten Exons fehlen (CD45₁₂₄₇) und zwei weitere Varianten (CD45₁₂₃₄₆₇ und CD45₁₂₄₆₇). Desweiteren lieferte die PCR Informationen darüber, welche Isoformen von CD45 in welchem Gewebe exprimiert werden. In der Bursa findet sich ausschließlich die CD45₁₂₃₄₅₆₇-Variante, wohingegen im Thymus die beiden kürzesten Isoformen vorkommen. In PBL und Milz werden alle vier Varianten exprimiert. Dies deckt sich mit früheren Immunpräzipitationsstudien [14, 89]. Interessanterweise exprimieren naive B-Zellen auch im Säuger fast ausschließlich CD45RABC und auch im Thymus dominieren kleinere Varianten von CD45 [8, 20, 21]. Hühner CD45 ist auf Leukozyten, jedoch nicht auf Erythrozyten, welche im Huhn kernhaltig sind, nachweisbar [14]. Auch auf Thrombozyten findet sich CD45, wenn

auch mit niedrigerem Expressionslevel [90]. Es konnten bisher eine Reihe an mAk generiert werden, welche CD45 im Huhn erkennen. Darunter fallen die mAk CL-1 [89], L.17 [93], LT40 [14], HIS-C7 [94], 16-6 [90] und CLA-1[95]. Jedoch erkennen alle diese Antikörper, mit Ausnahme des CLA-1, wahrscheinlich einen invariablen Bereich des Moleküls. Immunpräzipitationsstudien mit dem mAk CLA-1 zeigten, dass dieser kleinere Isoformen von CD45 auf Subpopulationen von Leukozyten bindet.

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein mAk (Klon 8B1) entwickelt werden, welcher die beiden kürzesten Isoformen von CD45 im Huhn erkennt. Die Spezifität des mAk wurde verifiziert, indem alle vier Splicevarianten von CD45 zur Expression in HEK-293-Zellen transfiziert wurden und anschließend die Bindung des Antikörpers an die einzelnen Isoformen per FACS-Analyse untersucht wurde. Mit Hilfe dieses mAk konnte im durchflusszytometrischen Verfahren die Expression der zwei kurzen Splicevarianten in verschiedenem Gewebe untersucht werden. Eine Expression konnte auf Makrophagen, Monozyten und Subpopulationen von Lymphozyten detektiert werden, jedoch nicht auf Thrombozyten, was anhand von Doppelfärbungen mit dem Thrombozytenmarker CLEC-2 (C-type lectin) verifiziert werden konnte.

Herausragend ist die Eigenschaft dieses Antikörpers, $\gamma\delta$ T-Zellen in den untersuchten Geweben Milz und PBL in zwei Populationen zu unterteilen; einer größeren $8B1^+$ und einer kleineren $8B1^-$ Zellpopulation. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die $8B1^-$ Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation von Milzzellen mit dem anti-CD3 mAk hochreguliert wird. Außerdem zeigt die $8B1^+$ Fraktion der $\gamma\delta$ T-Zellen eine höhere Dichte des TCR. Die Analyse der CD28 Expression auf unstimulierten und *in vitro* stimulierten Milzzellen und PBL diente dazu die $8B1^+$ und $8B1^-$ $\gamma\delta$ T-Zellen weiter zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Subpopulation von $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz und eine etwas kleinere Subpopulation in PBL $CD28^+$ sind. Eine frühere Studie konnte weder in der Milz, noch in PBL $CD28$ -Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen detektieren [96]. Dies könnte jedoch daran liegen, dass unterschiedliche Hühnerlinien verwendet wurden. Demgegenüber sind die Ergebnisse der Färbung der PBL in dieser Arbeit vergleichbar mit denen einer weiteren Studie [97]. Die Stimulation von Milzzellen mit IL-2 und IL-12 sorgte für eine Hochregulation der $CD28$ Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen auf ca. 68%. Immunfluoreszenzfärbung mit drei Farbstoffen ergab, dass nur eine kleine Population der $8B1^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen der unstimulierten Milzzellen und PBL $CD28^+$ sind. ($9\pm 1\%$ in Milz und $4\pm 1\%$ in PBL). Demgegenüber exprimiert eine größere Subpopulation der $8B1^-$ $\gamma\delta$ T-Zellen $CD28$ ($44\pm 4\%$ in Milz und $76\pm 1\%$ in PBL). $CD28$

wird sowohl auf der $8B1^+$ als auch auf der $8B1^-$ $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulation nach Stimulation von Milzzellen über einen Zeitraum von 96 Stunden hochreguliert. Jedoch ist die Frequenz der $CD28^+8B1^+$ $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulation viel höher (76,1%) als die der $CD28^+8B1^-$ T-Zellen (53,7%). Dadurch, dass Subpopulationen von $\gamma\delta$ T-Zellen mithilfe des mAk 8B1 identifiziert werden können, erweist sich dieser Antikörper als interessantes Instrument für die nähere Charakterisierung dieser bisher nur unzureichend erforschten Zellpopulation im Huhn.

Vertebraten können anhand der Frequenz der $\gamma\delta$ T-Zellen in ihren peripheren T-Zell-Populationen in 'low'-Spezies und 'high'-Spezies eingeteilt werden. Zur ersten Gruppe zählen zum Beispiel Mensch und Maus, bei welchen die $\gamma\delta$ T-Zellen ca. 5% des peripheren T-Zellpools darstellen. In die zweite Gruppe fallen unter anderem Rinder, Schafe, Kaninchen, Schweine und Hühner, bei welchen die $\gamma\delta$ T-Zellen bis zu 60% der T-Zellen umfassen [98-100]. Bei Hühnern bestehen die Lymphozyten im peripheren Blut bis zu 50% aus $\gamma\delta$ T-Zellen [92].

Obwohl $\gamma\delta$ T-Zellen im Huhn in hoher Frequenz vorkommen, ist diese Zellpopulation dennoch unzureichend charakterisiert. Nicht nur zu Funktion, sondern auch zu Phänotyp und Klassifizierung von Subpopulationen bedarf es noch an Forschung.

Ein universell einsetzbares System zur Klassifizierung von $\gamma\delta$ T-Zell Subpopulationen verschiedener Vertebraten konnte bis heute nicht etabliert werden. Beim Menschen werden zwei Hauptgruppen anhand der Expression des $V\delta 1$ oder $V\delta 2$ TCR definiert [101]. So tragen gewebeassoziierte $\gamma\delta$ T-Zellen vor allem den $V\delta 1$ TCR, wohingegen solche im peripheren Blut überwiegend $V\delta 2$ exprimieren. Bei Mäusen sind $\gamma\delta$ T-Zellen vorrangig in epithelalem Gewebe zu finden und können anhand der Expression der γ -Kette unterteilt werden. $\gamma\delta$ T-Zellen im Epithel des Uterus, Vagina und Zunge tragen überwiegend den $V\gamma 6V\delta 1$ TCR [102], während $V\gamma 5V\delta 1$ tragende T-Zellen in der Haut residieren [103].

Solch ein System zur Einteilung der $\gamma\delta$ T-Zellen des Huhns konnte noch nicht entwickelt werden und $V\gamma$ - sowie $V\delta$ -spezifische mAk stehen bislang nicht zur Verfügung. Desweiteren konnten bis heute nur sehr wenige Zelloberflächenmarker identifiziert werden, welche es ermöglichen Subpopulationen von $\gamma\delta$ T-Zellen zu definieren. Zu diesen gehören CD8, CD25, CD28, CD5 und CD6. CD8 ist ein nützlicher Marker anhand dessen Expression $\gamma\delta$ T-Zellen in $CD8\alpha^+$ high ($CD8\alpha\alpha^+$ und $CD8\alpha\beta^+$), $CD8\alpha^+$ dim und $CD8\alpha^-$ eingeteilt werden können [104, 105]. Auch mithilfe

von CD25 und CD28 lassen sich $\gamma\delta$ T-Zellen in Subpopulationen unterteilen. CD25 ist ein potenter Aktivierungsmarker [106] und das costimulatorische Molekül CD28 [97], präsent auf der Mehrheit der $\alpha\beta$ T-Zellen, ist auf allen $\gamma\delta$ T-Zellen im Thymus zu finden, aber abwesend auf der Mehrheit der peripheren $\gamma\delta$ T-Zellen [96]. CD6 findet man beim Huhn nur auf einer $CD8^+$ $\gamma\delta$ T-Zell Subpopulation in der Milz [107] und CD5 wird in niedrigen bis mittleren Konzentrationen auf $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert, je nach Lage im Gewebe [108].

Unter Berücksichtigung all dessen ist es von großem Interesse weitere Oberflächenmarker der $\gamma\delta$ T-Zellen zu identifizieren, welche es ermöglichen funktionelle Subpopulationen zu definieren. Da auch beim Huhn verschiedene Isoformen von CD45 durch alternatives Splicing entstehen, ist es durchaus möglich, dass, ähnlich wie beim Säuger, funktionelle Subpopulationen von $\gamma\delta$ T-Zellen anhand des Expressionsmusters der CD45 Isoformen identifiziert werden können.

Der mAk 8B1 färbt eine kleine Population von Bursazellen (1,5%) und eine etwas größere $AV20^+$ Population in der Milz an (8,2%). Jedoch werden keine B-Zellen in PBL erkannt. Die in der Einfachfärbung detektierte $8B1^+$ Zellpopulation in der Bursa steht im Gegensatz zu den PCR-Ergebnissen, in welchen ausschließlich die $CD45_{1234567}$ -Variante detektiert werden konnte. Es könnte sich bei der angefärbten Population um unspezifische Hintergrundfluoreszenz handeln. Jedoch muss dies in weiteren Färbungen näher untersucht werden. Desweiteren tragen fast alle $\alpha\beta$ T-Zellen in Milz und PBL die von diesem mAk erkannten Isoformen, wobei eine etwas größere Population in der Milz $8B1^-$ ist. Die FACS Analyse von aus PBMC gewonnenen Makrophagen und Monozyten zeigt, dass die zwei kurzen Isoformen von CD45 auch auf diesen Zellen exprimiert werden. Somit ist dieser Antikörper nicht nur hilfreich für die nähere Charakterisierung von $\gamma\delta$ T-Zellen, sondern wird in Zukunft auch bei der näheren Analyse weiterer Leukozyten des Huhns nützlich sein.

Durch Stimulation von Milzzellen mit immobilisiertem anti-CD3 mAk über 72 Stunden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass praktisch alle $TCR2^+$ und $TCR3^+$ Zellen ($\alpha\beta$ T-Zellen) die durch den mAk 8B1 erkannten Isoformen nach Aktivierung hochregulieren. Dies konnte auch für die $TCR1^+$ Zellen ($\gamma\delta$ T-Zellen) gezeigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die zwei kurzen Isoformen von CD45 auf aktivierten T-Zellen hochreguliert werden. Beim Säuger konnte *in vitro* nach Stimulation von PBL mit Phytohaemagglutinin (PHA) gezeigt werden, dass die 180kDa $CD45R0$ Splicevariante hochreguliert wird [109]. Somit erweisen sich bestimmte Splicevarianten

von CD45 möglicherweise auch beim Huhn hilfreich als Aktivierungsmarker unterschiedlicher T-Zellpopulationen.

Obgleich der generelle strukturelle Aufbau der Regionen der Ektodomäne unterschiedlicher Vertebraten und das alternative Splicing der N-terminalen Region phylogenetisch konserviert ist, zeigt der Vergleich der AS-Sequenz der extrazellulären Regionen des CD45 Moleküls eine extrem niedrige Ähnlichkeit. Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass Interaktionen mit potentiellen Liganden eher über die Kohlenhydratreste der Ektodomäne mediiert werden [7, 81]. Je nach Zellart, Differenzierungsgrad und Aktivierungszustand verändern sich die exprimierten Splicevarianten von CD45 [8, 20, 21]. Die Veränderung liegt aber nicht allein im differenziellen Splicing der Exons, sondern ist auch der variierenden Glykosylierung zu verdanken. Auf diese Weise werden wechselnde einzigartige Epitope auf der Zelloberfläche kreiert, an welche spezielle Liganden binden können. Die Bedeutung dieser variierenden Glykosylierung lässt sich zum Beispiel anhand der Anfälligkeit für den durch Galektin-1 vermittelten Zelltod der T-Zellen verdeutlichen. Expression spezifischer Glykosyltransferasen, welche spezielle Oligosaccharid-Liganden auf Glykoproteinen (auch CD45) bilden, hat einen positiv oder negativ regulatorischen Einfluss auf diesen [110]. Das Verständnis über die speziellen Veränderungen der CD45 Isoformen und Glykosylierungsmuster könnte weitere Einblicke geben in das Immunsystem und dessen Regulation.

MAk stellen hervorragende Werkzeuge dar um die Heterogenität der Glykosylierung und dessen Auswirkungen auf Funktion und Regulation von CD45 zu untersuchen. Da der mAk 8B1 einen Antikörper der IgM-Klasse darstellt, der Isotyp welcher primär bei der Immunantwort auf Saccharide gebildet wird, erkennt dieser wahrscheinlich ein Epitop, welches von den Kohlenhydratresten des CD45 Moleküls gebildet wird [111]. Gebunden werden zwei kurze CD45 Isoformen, denen beiden die Exons 3 und 5 fehlen und sich lediglich darin unterscheiden, dass der kürzeren Variante zusätzlich das Exon 6 fehlt. Es ist wahrscheinlich, dass der mAk 8B1 ein spezifisches Glykosylierungsmuster erkennt, welches aufgrund des alternativen Splicings allein auf diesen beiden Isoformen von CD45 zu finden ist. Für die Erforschung der Glykosylierung von CD45 bei Säugern stehen bereits einige mAk zur Verfügung. So erkennt zum Beispiel der Antikörper CZ-1 bei der Maus ein Sialinsäure-abhängiges Epitop auf CD45RB, welches nach Stimulation von CD4⁺ T-Zellen *in vitro* hochreguliert wird, wobei gleichzeitig die Isoform CD45RB runterreguliert wird [112]. Der mAk 8B1 stellt beim Huhn womöglich den ersten Antikörper dar, mit dessen Hilfe ein spezielles Glykosylierungsmuster auf den zwei

kurzen Isoformen von CD45 erforscht werden kann.

Interessant ist außerdem, dass der mAk 8B1 PBMC der Pute anfärbt. Dies ist durchaus nützlich, da auch für die Pute nur eine begrenzte Auswahl an Antikörpern für die Erforschung von Zellsubpopulationen zur Verfügung steht.

Zusammenfassend weist die Tatsache, dass dieser mAk Subpopulationen von Leukozyten erkennt, darauf hin, dass auch beim Huhn das alternative Splicing von CD45 und dessen Glykosylierung für die Funktion der exprimierenden Zellen von großer Bedeutung ist. Für die weitere Erforschung insbesondere der $\gamma\delta$ T-Zellen des Huhns stellt der mAk 8B1 ein hilfreiches Werkzeug dar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Herstellung neuer monoklonaler Antikörper zur Analyse der Expression verschiedener CD45 Isoformen auf Leukozyten des Haushuhns

Splicevarianten von CD45 konnten in einer Vielzahl verschiedener Spezies identifiziert werden und monoklonale Antikörper, welche verschiedene Isoformen spezifisch erkennen, stellen ein nützliches Werkzeug für die Charakterisierung zellulärer Subpopulationen von Leukozyten dar. Im Säuger können kernhaltige, hämatopoetische Zellen mithilfe exprimierter CD45 Isoformen entsprechend ihres Aktivierungszustands, Differenzierungsgrades und Zellart in Subpopulationen eingeteilt werden. Auch im Huhn entstehen durch alternatives Splicing unterschiedliche CD45 Isoformen. Die Verteilung spezifischer Splicevarianten, ihre Funktion und Regulation ist jedoch weitgehend unerforscht.

Ziel dieser Arbeit war es gegen CD45 gerichtete monoklonale Antikörper zu generieren, mit deren Hilfe insbesondere $\gamma\delta$ T-Subpopulationen näher charakterisiert werden können. Hierfür wurden $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz *in vitro* mit IL-2 und IL-12 expandiert und anschließend für die Immunisierung einer Maus verwendet. Zwei CD45-spezifische monoklonale Antikörper konnten identifiziert und charakterisiert werden.

Die Analyse der genomischen Struktur von CD45 ließ die Beteiligung dreier Exons am alternativen Splicing vermuten. Es konnten vier Isoformen von CD45 kloniert und zur Expression stabil in 293-HEK Zellen transfiziert werden. Dazu zählte die Full-length Variante, welche alle alternativ gespliceten Exons besitzt, eine Variante, der alle drei alternativ gespliceten Exons fehlen und zwei weitere Varianten. Der generierte monoklonale Antikörper 7D12 erkennt alle exprimierten Isoformen von CD45, während der monoklonale Antikörper 8B1 spezifisch zwei kurze Varianten erkennt, von denen einer Variante die Exons 3 und 5 fehlen und der zweiten Variante zusätzlich das Exon 6 fehlt. Immunfluoreszenz Analyse primärer Zellen ergab, dass der 7D12 alle Leukozyten, inklusive Thrombozyten, erkennt. Der 8B1 jedoch färbt lediglich Lymphozyten und Monozyten an. So erkennt dieser Antikörper im Blut fast alle $\alpha\beta$ T-Zellen, wobei eine Subpopulation von $\gamma\delta$ T-Zellen 8B1⁻ ist und praktisch keine B-Zellen erkannt werden. In der Milz existieren eine etwas größere 8B1⁻ $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation, verglichen mit PBL, jedoch ist hier eine 8B1⁺ B-Zellsubpopulation zu finden. CD3-Stimulation von T-Zellen der Milz führt zur Hochregulation des von

8B1 erkannten Epitops auf allen T-Zellen. Ein Unterschied zwischen den 8B1⁺ und 8B1⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen besteht in ihrer Expression von CD28. 8B1⁺ Zellen zeigen ein höheres CD28 Expressionslevel als 8B1⁻ Zellen und das CD28 Antigen wird bei Stimulation der Zellen mit IL-2 und IL-12 hochreguliert.

Zusammenfassend stellt der monoklonale Antikörper 8B1 ein hervorragendes Werkzeug dar, um Subpopulationen von Leukozyten zu identifizieren und insbesondere $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen näher zu charakterisieren.

7. SUMMARY

Manufacture of new monoclonal antibodies for the analysis of CD45 isoform expression on leukocytes of the chicken

CD45 splice variants have been identified in various different species and monoclonal antibodies directed against different isoforms have been instrumental to define subsets of leukocytes. In mammals nucleated hematopoietic cells can be divided into subpopulations according to their activation status, differentiation state and cell type depending on the expressed CD45 isoforms. In the chicken, different CD45 isoforms arise from alternative splicing as well. The distribution of specific splice variants, their function and regulation however, are only poorly characterized.

The aim of this study was to generate CD45 specific monoclonal antibodies useful for the characterization of leukocytes, especially $\gamma\delta$ T cell subsets. For this purpose, splenic $\gamma\delta$ T cells were expanded *in vitro* in the presence of IL-2 and IL-12 and subsequently used for immunizing a mouse. Two CD45 specific monoclonal antibodies were identified and characterized.

The analysis of the genomic structure of CD45 suggested three exons being involved in alternative splicing. Four isoforms of CD45 were cloned and stably transfected into 293-HEK cells for expression. The full-length form was identified, containing all alternatively spliced exons, an isoform lacking all of the alternatively spliced exons and two more isoforms. The monoclonal antibody 7D12 binds all of the expressed CD45 splice variants, while the 8B1 monoclonal antibody specifically binds two short variants, one missing exons 3 and 5 and another missing exons 3, 5 and 6. Immunofluorescence analysis revealed 7D12 staining of all leukocytes, including thrombocytes. The 8B1 however, only reacts with lymphocytes and monocytes. In blood this monoclonal antibody binds almost all $\alpha\beta$ T cells, while a small subpopulation of $\gamma\delta$ T cells is 8B1⁻ and almost no B cells are positive for staining. In the spleen a larger subpopulation of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells is 8B1⁻, while a small 8B1⁺ B-cell subpopulation can be found. CD3 stimulation of splenic T cells results in the upregulation of the antigen recognized by the 8B1 monoclonal antibody on all the cells. A difference between the 8B1⁺ and 8B1⁻ $\gamma\delta$ T cells exists in their expression of the CD28 molecule. The 8B1⁺ cells exhibit higher expression levels of CD28 than the 8B1⁻ population. Stimulation of the cells with IL-2 and IL-12 leads to an upregulation of the

CD28 expression on all cells.

In summary, the 8B1 monoclonal antibody provides an excellent tool for defining subsets of leukocytes and especially for further analysis of the still poorly characterized chicken $\gamma\delta$ T cells.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Murphy, K.M., *Chapter 1: Basic concepts in immunology*, in *Janeway's immunobiology* 2012, Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC: New York. p. 3-4.
2. Zhang, Z.-Y., *Protein-Tyrosine Phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1998. **33**(1): p. 1-52.
3. Hallé, M., M.L. Tremblay, and T.-C. Meng, *Protein Tyrosine Phosphatases: emerging regulators of apoptosis*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(22): p. 2773-2781.
4. Samelson, L.E., et al., *Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor*. *Cell*, 1986. **46**(7): p. 1083-1090.
5. Saltzman, E.M., R.R. Thom, and J.E. Casnellie, *Activation of a tyrosine protein kinase is an early event in the stimulation of T lymphocytes by interleukin-2*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(15): p. 6956-6959.
6. Woodford-Thomas, T. and M.L. Thomas, *The leukocyte common antigen, CD45 and other protein tyrosine phosphatases in hematopoietic cells*. *Seminars in Cell Biology*, 1993. **4**(6): p. 409-418.
7. Thomas, M.L., *The leukocyte common antigen family*. *Annual Review of Immunology*, 1989. **7**(1): p. 339-369.
8. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss, *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells*. *Annual Review of Immunology*, 2003. **21**(1): p. 107-137.
9. Cross, J.L., et al., *CD45 regulates TLR-induced proinflammatory cytokine and IFN- β secretion in dendritic cells*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(12): p. 8020-8029.
10. Berger, S.A., T.W. Mak, and C.J. Paige, *Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1994. **180**(2): p. 471-476.
11. Roach, T., et al., *CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion*. *Current Biology*, 1997. **7**(6): p. 408-417.
12. Irie-Sasaki, J., et al., *CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling*. *Nature*, 2001. **409**(6818): p. 349-354.
13. Harvath, L., et al., *Selected antibodies to leukocyte common antigen (CD45) inhibit human neutrophil chemotaxis*. *The Journal of Immunology*, 1991. **146**(3): p. 949-957.

14. Paramithiotis, E., L. Tkalec, and M.J. Ratcliffe, *High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes*. *The Journal of Immunology*, 1991. **147**(11): p. 3710-3717.
15. Charbonneau, H., et al., *Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989. **86**(14): p. 5252-5256.
16. Trowbridge, I.S. and M.L. Thomas, *CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development*. *Annual Review of Immunology*, 1994. **12**(1): p. 85-116.
17. Iida, N., V.B. Lokeshwar, and L.Y. Bourguignon, *Mapping the fodrin binding domain in CD45, a leukocyte membrane-associated tyrosine phosphatase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. **269**(46): p. 28576-28583.
18. Wang, Y. and P. Johnson, *Expression of CD45 lacking the catalytic protein tyrosine phosphatase domain modulates lck phosphorylation and T cell activation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(14): p. 14318-14324.
19. Streuli, M., et al., *Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1987. **166**(5): p. 1548-1566.
20. Fukuhara, K., et al., *A study on CD45 isoform expression during T-cell development and selection events in the human thymus*. *Human Immunology*, 2002. **63**(5): p. 394-404.
21. Hathcock, K.S., et al., *CD45 expression by B cells. Expression of different CD45 isoforms by subpopulations of activated B cells*. *The Journal of Immunology*, 1992. **149**(7): p. 2286-2294.
22. McNeill, L., et al., *CD45 isoforms in T cell signalling and development*. *Immunology Letters*, 2004. **92**(1): p. 125-134.
23. Deans, J.P., A.W. Boyd, and L.M. Pilarski, *Transitions from high to low molecular weight isoforms of CD45 (T200) involve rapid activation of alternate mRNA splicing and slow turnover of surface CD45R*. *The Journal of Immunology*, 1989. **143**(4): p. 1233-1238.
24. Krzywinska, E., et al., *Identification of anti-tumor cells carrying natural killer (NK) cell antigens in patients with hematological cancers*. *EBioMedicine*, 2015. **2**(10): p. 1364-1376.
25. Sato, T., et al., *Structural study of the sugar chains of human leukocyte common antigen CD45*. *Biochemistry*, 1993. **32**(47): p. 12694-12704.
26. Pulido, R. and F. Sánchez-Madrid, *Glycosylation of CD45: carbohydrate processing*

- through Golgi apparatus is required for cell surface expression and protein stability.* European Journal of Immunology, 1992. **22**(2): p. 463-468.
27. Furukawa, K., et al., *Structural study of the O-linked sugar chains of human leukocyte tyrosine phosphatase CD45.* European Journal of Biochemistry, 1998. **251**(1-2): p. 288-294.
 28. Earl, L.A. and L.G. Baum, *CD45 Glycosylation controls T-cell life and death.* Immunology and Cell Biology, 2008. **86**(7): p. 608-615.
 29. Camby, I., et al., *Galectin-1: a small protein with major functions.* Glycobiology, 2006. **16**(11): p. 137R-157R.
 30. Perillo, N.L., et al., *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1.* Nature, 1995. **378**(6558): p. 736-739.
 31. Walzel, H., et al., *Galectin-1, a natural ligand for the receptor-type protein tyrosine phosphatase CD45.* Immunology Letters, 1999. **67**(3): p. 193-202.
 32. Stillman, B.N., et al., *Galectin-3 and Galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death.* The Journal of Immunology, 2006. **176**(2): p. 778-789.
 33. Stamenkovic, I., et al., *The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells.* Cell, 1991. **66**(6): p. 1133-1144.
 34. van Vliet, S.J., E. Saeland, and Y. van Kooyk, *Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function.* Trends in Immunology, 2008. **29**(2): p. 83-90.
 35. van Vliet, S.J., et al., *Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45.* Nature Immunology, 2006. **7**(11): p. 1200-1208.
 36. Alexander, D.R., *The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function.* Seminars in Immunology, 2000. **12**(4): p. 349-359.
 37. Justement, L.B., *The role of CD45 in signal transduction.* Advances in Immunology, 1997. **66**: p. 1-65.
 38. Felberg, J. and P. Johnson, *Characterization of recombinant CD45 cytoplasmic domain proteins: evidence for intramolecular and intermolecular interactions* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(28): p. 17839-17845.
 39. Lokeshwar, V.B. and L.Y. Bourguignon, *Tyrosine phosphatase activity of lymphoma CD45 (GP180) is regulated by a direct interaction with the cytoskeleton.* Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(30): p. 21551-21557.
 40. Pradhan, D. and J.S. Morrow, *The Spectrin-Ankyrin Skeleton controls CD45 surface*

- display and Interleukin-2 production*. *Immunity*, 2002. **17**(3): p. 303-315.
41. Iwashima, M., et al., *Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases*. *Science*, 1994. **263**(5150): p. 1136-1139.
 42. DeFranco, A.L., *B-cell activation 2000*. *Immunological Reviews*, 2000. **176**(1): p. 5-9.
 43. D'Oro, U. and J.D. Ashwell, *Cutting Edge: The CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of lck activity in thymocytes*. *The Journal of Immunology*, 1999. **162**(4): p. 1879-1883.
 44. Seavitt, J.R., et al., *Expression of the p56(lck) Y505F mutation in CD45-deficient mice rescues thymocyte development*. *Molecular and Cellular Biology*, 1999. **19**(6): p. 4200-4208.
 45. D'Oro, U., et al., *Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996. **16**(9): p. 4996-5003.
 46. Saunders, A.E. and P. Johnson, *Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45*. *Cellular Signalling*, 2010. **22**(3): p. 339-348.
 47. Ostergaard, H.L., et al., *Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989. **86**(22): p. 8959-8963.
 48. Katagiri, T., et al., *Selective regulation of lyn tyrosine kinase by CD45 in immature B cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(47): p. 27987-27990.
 49. Williams, J.C., R.K. Wierenga, and M. Saraste, *Insights into Src kinase functions: structural comparisons*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998. **23**(5): p. 179-184.
 50. Katagiri, T., et al., *CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells*. *The Journal of Immunology*, 1999. **163**(3): p. 1321-1326.
 51. Ashwell, J.D. and U. D'Oro, *CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different*. *Immunology Today*, 1999. **20**(9): p. 412-416.
 52. Shrivastava, P., et al., *Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells*. *Blood*, 2004. **103**(4): p. 1425-1432.
 53. Rudd, C.E., et al., *The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988. **85**(14): p. 5190-5194.
 54. Veillette, A., et al., *The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck*. *Cell*, 1988. **55**(2): p. 301-308.

55. Shaw, A.S., et al., *The Ick tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain*. Cell, 1989. **59**(4): p. 627-636.
56. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(39): p. 16916-16921.
57. Kishihara, K., et al., *Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-Exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice*. Cell, 1993. **74**(1): p. 143-156.
58. Byth, K.F., et al., *CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **183**(4): p. 1707-1718.
59. Justement, L., et al., *Regulation of B cell antigen receptor signal transduction and phosphorylation by CD45*. Science, 1991. **252**(5014): p. 1839-1842.
60. Benhamou, M. and R.P. Siraganian, *Protein-tyrosine phosphorylation: an essential component of FcεRI signaling*. Immunology Today, 1992. **13**(6): p. 195-197.
61. Hong, H., et al., *The Src family kinase Hck regulates mast cell activation by suppressing an inhibitory Src family kinase Lyn*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2511-2519.
62. Zhang, H., et al., *The Src family kinases Hck and Fgr negatively regulate neutrophil and dendritic cell chemokine signaling via PIR-B*. Immunity, 2005. **22**(2): p. 235-246.
63. Liles, W.C., et al., *Cross-linking of CD45 enhances activation of the respiratory burst in response to specific stimuli in human phagocytes*. The Journal of Immunology, 1995. **155**(4): p. 2175-2184.
64. Bilwes, A.M., et al., *Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- α by dimerization*. Nature, 1996. **382**(6591): p. 555-559.
65. Desai, D.M., et al., *Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase*. Cell, 1993. **73**(3): p. 541-554.
66. Nam, H.-J., et al., *Structural basis for the function and regulation of the receptor protein tyrosine phosphatase CD45*. The Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(3): p. 441-452.
67. Holmes, N., *CD45: all is not yet crystal clear*. Immunology, 2006. **117**(2): p. 145-155.
68. Xu, Z. and A. Weiss, *Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms*. Nature Immunology, 2002. **3**(8): p. 764-771.
69. Edmonds, S.D. and H.L. Ostergaard, *Dynamic association of CD45 with detergent-*

- insoluble microdomains in T lymphocytes*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(9): p. 5036-5042.
70. Davidson, D., et al., *Phosphorylation-dependent regulation of T-cell activation by PAG/Cbp, a lipid raft-associated transmembrane adaptor*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(6): p. 2017-2028.
 71. Brdička, T., et al., *Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (Pag), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase Csk and is involved in regulation of T cell activation*. The Journal of Experimental Medicine, 2000. **191**(9): p. 1591-1604.
 72. Wang, Y., et al., *Phosphorylation of CD45 by Casein Kinase 2: modulation of activity and mutational analysis* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(11): p. 7454-7461.
 73. Fialkow, L., C.K. Chan, and G.P. Downey, *Inhibition of CD45 during neutrophil activation*. The Journal of Immunology, 1997. **158**(11): p. 5409-5417.
 74. Hall, L.R., et al., *Complete exon-intron organization of the human leukocyte common antigen (CD45) gene*. The Journal of Immunology, 1988. **141**(8): p. 2781-2787.
 75. Saga, Y., et al., *Sequences of Ly-5 cDNA: isoform-related diversity of Ly-5 mRNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(18): p. 6940-6944.
 76. Maddox, J.F., C.R. Mackay, and M.R. Brandon, *The sheep analogue of leucocyte common antigen (LCA)*. Immunology, 1985. **55**(2): p. 347-353.
 77. Montoya, G.E., J.P. Vernot, and M.E. Patarroyo, *Comparative analysis of CD45 proteins in primate context: owl monkeys vs humans*. Tissue Antigens, 2004. **64**(2): p. 165-172.
 78. Barclay, A.N., et al., *Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T200) is due to differences in polypeptide sequences near the NH2-terminus*. The EMBO Journal, 1987. **6**(5): p. 1259-1264.
 79. Ballingall, K.T., et al., *The CD45 locus in cattle: allelic polymorphism and evidence for exceptional positive natural selection*. Immunogenetics, 2001. **52**(3): p. 276-283.
 80. Fang, K.S., et al., *A transmembrane protein-tyrosine phosphatase contains spectrin-like repeats in its extracellular domain*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(19): p. 14056-14063.
 81. Okumura, M., et al., *Comparison of CD45 extracellular domain sequences from divergent vertebrate species suggests the conservation of three fibronectin type III domains*. The Journal of Immunology, 1996. **157**(4): p. 1569-1575.
 82. Nagata, T., et al., *The leukocyte common antigen (CD45) of the Pacific hagfish*,

- Eptatretus stoutii*: implications for the primordial function of CD45. Immunogenetics, 2002. **54**(4): p. 286-291.
83. Uinuk-ool, T., et al., *Organization, alternative splicing, polymorphism, and phylogenetic position of lamprey CD45 gene*. Immunogenetics, 2005. **57**(8): p. 607-617.
84. Díaz del Pozo, E., P.C.L. Beverley, and M. Timón, *Genomic structure and sequence of the leukocyte common antigen (CD45) from the pufferfish *Fugu rubripes* and comparison with its mammalian homologue*. Immunogenetics, 2000. **51**(10): p. 838-846.
85. Fujiki, K., et al., *Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leukocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor β , CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridisation*. Fish & Shellfish Immunology, 2000. **10**(7): p. 643-650.
86. Kountikov, E., et al., *Expression of alternatively spliced CD45 isoforms by channel catfish clonal T and B cells is dependent on activation state of the cell and regulated by protein synthesis and degradation*. Developmental & Comparative Immunology, 2010. **34**(10): p. 1109-1118.
87. Barritt, L.C. and J.B. Turpen, *Characterization of lineage restricted forms of a *Xenopus* CD45 homologue*. Developmental & Comparative Immunology, 1995. **19**(6): p. 525-536.
88. Smith, P.B. and J.B. Turpen, *Expression of a leukocyte-specific antigen during ontogeny in *Xenopus laevis**. Developmental Immunology, 1991. **1**(4): p. 295-307.
89. Houssaint, E., et al., *A chicken leukocyte common antigen: biochemical characterization and ontogenetic study*. European Journal of Immunology, 1987. **17**(2): p. 287-290.
90. Viertlboeck, B.C. and T.W. Göbel, *Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007. **119**(1): p. 137-141.
91. Fang, K.S., et al., *Comparative study of three protein-tyrosine phosphatases. Chicken protein-tyrosine phosphatase lambda dephosphorylates c-Src tyrosine 527*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(31): p. 20194-200.
92. Arstila, T.P. and O. Lassila, *Androgen-induced expression of the peripheral blood gamma delta T cell population in the chicken*. The Journal of Immunology, 1993. **151**(12): p. 6627-6633.
93. Pink, J.R. and A.-M. Rijnbeek, *Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens*. Hybridoma, 1983. **2**(3): p. 287-296.
94. Jeurissen, S.H.M., et al., *Monoclonal antibodies as probes for defining cellular subsets in the bone marrow, thymus, bursa of Fabricius, and spleen of the chicken*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1988. **19**(3): p. 225-238.

95. Chen, C.H., M. D. Cooper., *Identification of cell surface molecules on chicken lymphocytes with monoclonal antibodies*. Avian Immunology: Basis and Practice, 1987. **1**: p. 137.
96. Vainio, O., et al., *Characterization of the putative avian CD2 homologue*. The Journal of Immunology, 1991. **147**(5): p. 1593-1599.
97. Koskela, K., T.P. Arstila, and O. Lassila, *Costimulatory function of CD28 in avian $\gamma\delta$ T cells is evolutionarily conserved*. Scandinavian Journal of Immunology, 1998. **48**(6): p. 635-641.
98. Su, C., et al., *Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds*. Immunogenetics, 1999. **50**(5): p. 301-308.
99. Takamatsu, H.H., et al., *Porcine $\gamma\delta$ T cells: Possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2006. **112**(1): p. 49-61.
100. Hein, W.R. and L. Dudler, *Divergent evolution of T cell repertoires: extensive diversity and developmentally regulated expression of the sheep gamma delta T cell receptor*. The EMBO Journal, 1993. **12**(2): p. 715-724.
101. Kalyan, S. and D. Kabelitz, *Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic*. Cellular and Molecular Immunology, 2013. **10**(1): p. 21-29.
102. Itohara, S., et al., *Homing of a $\gamma\delta$ thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 754-757.
103. Tigelaar, R.E. and J.M. Lewis, *Immunobiology of mouse dendritic epidermal T cells: a decade later, some answers, but still more questions*. Journal of Investigative Dermatology, 1995. **105**: p. 43S-49S.
104. Tregaskes, C.A., et al., *Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes*. The Journal of Immunology, 1995. **154**(9): p. 4485-4494.
105. Berndt, A., J. Pieper, and U. Methner, *Circulating $\gamma\delta$ T Cells in Response to Salmonella enterica Serovar Enteritidis Exposure in Chickens*. Infection and Immunity, 2006. **74**(7): p. 3967-3978.
106. Braukmann, M., U. Methner, and A. Berndt, *Avian CD25+ gamma/delta ($\gamma\delta$) T cells after Salmonella exposure*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2015. **168**(1): p. 14-18.
107. Göbel, T.W.F., C.-L.H. Chen, and M.D. Cooper, *Expression of an avian CD6 candidate is restricted to $\alpha\beta$ T cells, splenic CD8+ $\gamma\delta$ T cells and embryonic natural killer cells*.

- European Journal of Immunology, 1996. **26**(8): p. 1743-1747.
108. Koskinen, R., et al., *The Structure of Avian CD5 Implies a Conserved Function*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(10): p. 4943-4950.
109. Akbar, A.N., et al., *Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells*. The Journal of Immunology, 1988. **140**(7): p. 2171-2178.
110. Nguyen, J.T., et al., *CD45 modulates Galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-Glycans*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(10): p. 5697-5707.
111. Heimburg-Molinaro, J. and K. Rittenhouse-Olson, *Development and characterization of antibodies to carbohydrate antigens*, in *Glycomics: Methods and Protocols*, N.H. Packer and N.G. Karlsson, Editors. 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 341-357.
112. Varga, S.M. and R.M. Welsh, *The CD45RB-associated epitope defined by monoclonal antibody CZ-1 is an activation and memory marker for mouse CD4 T cells*. Cellular Immunology, 1996. **167**(1): p. 56-62.

9. DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Göbel für das technisch reizvolle als auch fachlich äußerst interessante Dissertationsthema. Dass er mir unermüdlich mit Erklärungen und Hilfestellungen zur Seite stand, die hervorragende fachliche Betreuung, Motivation sowie konstruktiven Ratschläge trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Desweiteren gebührt Sieglinde Hirmer ein besonderer Dank für ihr herausragendes Engagement und kompetente Unterstützung, welche von unschätzbarem Wert für dieses Projekt waren.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers, Frau PD Dr. Sonja Härtle und Frau PD Dr. Birgit Viertlböck für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen bedanken. Ihre konstruktive Kritik und Ratschläge waren eine große Bereicherung.

Bei Fritz Meggendorfer, Andreas Schöffmann, Daniele Hölle und Thomas Hoschka bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit im Tierstall und für die Betreuung der Tiere. Herrn Franz Schmitt danke ich für die freundliche Unterstützung bei anfallenden Reparaturen im Labor.

Ein riesiger Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Deeg und Kaspers für die kollegiale Zusammenarbeit und manch einen erheiternden Kaffeeklatsch. Besonders danken möchte ich Marina Kohn und Beatrice Schaerer für die freundliche und stets motivierte Hilfsbereitschaft in technischen und fachlichen Fragestellungen.

An die Kollegen meiner Arbeitsgruppe, Isabelle Walliser, Lisa Fenzl und Stephanie Scherer geht ein großes Dankeschön für das angenehme Arbeitsklima und die nette Zusammenarbeit. Marie-Luise Neulen möchte ich für die unermüdliche und kompetente Hilfe ganz herzlich danken. Ich bedanke mich auch bei Vanessa Turowski und Bernhard Mutze für die herzliche Aufnahme, geduldige Einarbeitung und stete Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt Lisa Fenzl und Stephanie Scherer, mit denen ich zwei liebe Freunde dazugewonnen habe. Für die schöne gemeinsame Zeit, manch einen heiteren Moment und sehr geschätzte Hilfsbereitschaft möchte ich mich herzlich bedanken.

Allen meinen lieben Freunden ein großes Dankeschön für das offene Ohr und dass sie in jeder Lebenssituation immer mit Rat und Tat an meiner Seite standen. Besonders danke ich Sonja Jung, Sophie Watz und Felix Rätzke für die vielen lustigen Stunden. Ihre Aufmunterung und

Geduld konnten mich stets aufbauen. Ein großer Dank an Sebastian Weyand und Tatjana Donauer für die Camping-Trips, die Grillabende und den unersetzlichen Beistand in allen Lebenslagen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Geschwistern und Moritz Volling dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben. Sie standen mir stets zur Seite und teilten jedes Lachen und Weinen mit mir. Für ihre Geduld, ihren Rat, ihre Aufmunterung und Liebe bin ich unendlich dankbar.

Familie Volling möchte ich besonders danken für ihre Unterstützung und Motivation.