

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel

Charakterisierung von Hühner CRTAM

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Maria Zechmann
aus Hutthurm

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Göbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael Erhard
Univ.-Prof. Dr. Rolf Mansfeld
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel
Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	ZIELSETZUNG	3
3.	LITERATURÜBERSICHT	4
3.1	Nectine und Nectin-ähnliche Proteine.....	4
3.1.1	Nectine	4
3.1.2	Necls.....	5
3.1.3	Funktionen.....	6
3.1.4	Bindung und Bindungspartner	9
3.2	Ig-ähnliche Rezeptoren die an Nectine und Necls binden	10
3.2.1	CD96	10
3.2.2	CD226	11
3.2.3	TIGIT	12
3.2.4	CRTAM.....	14
3.3	CRTAM beim Huhn.....	16
4.	PUBLIKATION	18
5.	DISKUSSION	53
6.	ZUSAMMENFASSUNG	59
7.	SUMMARY.....	61
8.	LITERATURVERZEICHNIS	62
9.	DANKSAGUNG	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	<i>antigen presenting cell</i>
CADM	<i>cell adhesion molecule</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CASK	<i>calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
CEA	<i>carcinoembryonic antigen</i>
CRTAM	<i>class I restricted T cell associated molecule</i>
cTADS	<i>chicken thymic activation and developmental sequence</i>
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DAL1	<i>differentially expressed in adenocarcinoma of the lung</i>
DAP-12	<i>DNAX activation protein of 12 kDa</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DNAM1	<i>DNAX accessory molecule 1</i>
FcεRIγ	<i>γ-subunit of the high-affinity IgE receptor</i>
HIV1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HSV	Herpes simplex Virus
IEL	intestinale intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGSF	<i>immunoglobulin superfamily member</i>
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
JAM	<i>junctional cell adhesion molecule</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
MAGUK	<i>membrane-associated guanylate kinase</i>
MPP3	<i>membrane palmitoylated protein 3</i>
Muc-18	<i>Mucin-18</i>
MUPP1	<i>multiple PDZ domain protein 1</i>
MV	Masernvirus
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
Nect1	<i>Nectin-like</i>
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Pals2	<i>protein associated with Lin-7 2</i>
Par-3	<i>partitioning defective 3 homologue</i>
PATJ	<i>Pals-1 associated tight junction protein</i>
PDZ	<i>postsynaptic density 95/discs large/zona occludens-1</i>

PICK1	<i>protein interacting with protein kinase C alpha 1</i>
PRR	<i>poliovirus receptor/related protein</i>
PTA1	<i>platelet and T cell activation antigen 1</i>
PV	Poliovirus
PVR	<i>poliovirus receptor</i>
PVRL 2	<i>poliovirus receptor-related 2</i>
SHIP	<i>src-homology 2-containing inositolpolyphosphat-5'-phosphatase</i>
SHP	<i>src homology phosphatase</i>
SYNCAM	<i>synaptic cell adhesion molecule</i>
Tactile	<i>T cell activation, increased late expression</i>
TAGE4	<i>tumor associated glycoprotein E4</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Tctex-1	<i>T-complex-associated-testis-expressed 1</i>
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TLiSA1	<i>T lineage-specific activation antigen 1</i>
TSLC	<i>tumor suppressor in lung cancer</i>
TSLL	<i>tumor suppressor in lung cancer like</i>
VSTM3	<i>V-set and transmembrane domain-containing protein 3</i>
WUCAM	<i>Washington University cell adhesion molecule</i>

1. EINLEITUNG

Das Immunsystem hat sich dahingehend entwickelt, starke Immunantworten gegen Pathogene auslösen zu können, ohne eine überschießende Immunreaktion und somit Autoimmunität zu erzeugen. Ermöglicht wird dies durch ein Zusammenspiel von stimulatorischen und inhibitorischen Rezeptoren in Kombination mit kostimulatorisch wirkenden Rezeptoren, welche zur Regulation des Immunsystems und zur Feinabstimmung immunologischer Abläufe beitragen. Leukozyten weisen eine Vielzahl solcher aktivierender und hemmender Signalwege auf, welche miteinander interagieren, um das homöostatische Gleichgewicht aufrecht zu erhalten und die zelluläre Antwort auf diverse Stimuli zu modulieren. Die ihnen vorgeschalteten Rezeptoren zeichnen sich dabei durch ganz charakteristische Merkmale aus.

Hemmende Rezeptoren besitzen einen langen zytoplasmatischen Anteil mit einem charakteristischen *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM), eine sechs Aminosäuren lange Sequenz, zusammengesetzt aus (I/V/L/S)-X-Y-X-X-(L/V), wobei X irgendeine Aminosäure kennzeichnet [1]. Dieses wird nach Ligandenbindung Tyrosin-phosphoryliert. Dabei wird eine Kaskade ausgelöst, in der unter anderem Tyrosin-Phosphatasen, wie z.B. *src homology phosphatase 1* und *2* (SHP-1 und SHP-2) sowie *src-homology 2-containing inositolpolyphosphat-5'-phosphatase* (SHIP) rekrutiert werden [2]. Diese inhibitorischen Rezeptoren sind auf der Zelloberfläche vorwiegend in Kombination mit aktivierenden Gegenspielern exprimiert. Deren zytoplasmatische Enden sind meist kurz und zeigen kein ITIM-Motiv. Sie besitzen jedoch in ihrer transmembranen Region eine positiv geladene Aminosäure, welche die Bindung von Adaptormolekülen wie z.B. *γ-subunit of the high-affinity IgE receptor* (FcεRIγ), CD3ζ oder *DNAX activation protein of 12 kDa* (DAP-12) vermitteln [3]. Diese Adaptormoleküle weisen ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) auf, welches nach Ligandenbindung an den Tyrosinresten phosphoryliert wird und somit Signale übermittelt [4].

Die Rezeptoren können anhand ihrer extrazellulären Struktur unterschiedlichen Gruppen zugeteilt werden. Ein oder mehrere Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen kennzeichnen Mitglieder der Ig-Superfamilie, wohingegen den C-Typ Lectinen eine extrazelluläre Lectinstruktur zu eigen ist.

Während der letzten Jahre wurden große Bemühungen angestellt, dieses Zusammenspiel immunmodulatorischer Signalwege zu charakterisieren und vor allem die Feinabstimmung der Signale durch kostimulatorische Rezeptoren zu untersuchen. Interessanterweise nehmen oft mehrere Rezeptor-Ligandenpaare Einfluss auf denselben kostimulatorischen Weg, so z.B. CD28 und *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4), welche an B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) binden, wobei CD28 positive und CTLA4 negative Signale vermittelt [5]. Seit einiger Zeit ist ein neues Paar von Rezeptoren in der Diskussion, welches unter Umständen auf ähnliche Weise wirken könnte: *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (TIGIT) als hemmender und CD226 als potentiell aktivierender Rezeptor, welche beide um den Liganden CD155 konkurrieren [6]. Diese Rezeptoren gehören zusammen mit CD96 und *class I restricted T cell associated molecule* (CRTAM) zu einer Gruppe von Ig-Superfamilie-Molekülen, die nicht nur immunmodulatorische Eigenschaften aufweist, sondern auch Zelladhäsion vermittelt. Ihnen ist außerdem gemeinsam, dass sie an Familienmitglieder der Nectin- und *Nectin-like* (Nect) Protein Familie binden, welche neben den Cadherinen zu den *cell adhesion molecules* (CAMs) zählen und eine Schlüsselrolle in verschiedensten biologischen Prozessen wie Zellpolarität, Zellproliferation, Zellmigration, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion spielen. Auch sind sie beim Menschen in diverse pathologische Prozesse involviert, so dienen einige Mitglieder beispielsweise als Virusrezeptoren oder sind in Tumorgeschehen verwickelt [7, 8].

Auch im Hühnergenom können die Gene für CRTAM, CD96 und CD226 gefunden werden, wobei im Huhn die Funktionen dieser Rezeptoren im Speziellen und die Mechanismen der Immunmodulation im Allgemeinen weitgehend unerforscht sind.

2. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es den Immunrezeptor CRTAM beim Huhn zu charakterisieren, um zum einen mögliche Oberflächenmarker für die spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort zu erhalten und so genauere Einblicke in die adaptive Immunantwort beim Huhn zu erlangen. Zum anderen sollte die Charakterisierung dieses Markers im Zusammenspiel mit der künftigen Charakterisierung der weiteren Rezeptoren seiner Familie dazu beitragen, immunmodulatorische Vorgänge im Huhn nachzuvollziehen.

Ein erster Schritt in diese Richtung wurde mit der Generierung eines monoklonalen Antikörpers gegen die extrazelluläre Struktur von CRTAM erreicht. Dazu war es zuerst notwendig, den Rezeptor im Hühnergenom zu identifizieren, ihn zu klonieren und auf verschiedenen Zelllinien zu exprimieren. Nachfolgend konnte mithilfe dieser stabilen Zelllinien, durch Immunisierung einer Maus, ein CRTAM-spezifischer monoklonaler Antikörper hergestellt und die Gewebeverteilung dieses Rezeptors im Huhn untersucht werden.

Weiterhin sollte der Bindungspartner dieses Rezeptors charakterisiert werden, der bei Mensch und Maus das *Nectin-like Protein 2* (Necl-2) darstellt [9-11]. Sequenzvergleiche von CRTAM zwischen Mensch und Huhn zeigten hohe Aminosäuren-Sequenz-Ähnlichkeit auf. So lag die Vermutung nahe, dass auch das Hühner Necl-2 ein Bindungspartner für Hühner CRTAM sein könnte.

Durch Klonierung und Expression dieses Liganden auf einer Zelllinie und nachfolgend durchgeführten Rezeptor-Liganden-Bindungsversuchen sollte diese Annahme bestätigt werden.

3. LITERATURÜBERSICHT

3.1 Nectine und Nectin-ähnliche Proteine

Nectine und Necls sind Mitglieder der Ig-Superfamilie von Proteinen. Sie vermitteln Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell-Adhäsionen durch sowohl homophile als auch heterophile trans-Interaktionen, das heißt zwischen gleichen Familienmitgliedern, bzw. auch unterschiedlichen Familienmitgliedern oder Mitgliedern anderer Familien. In ihrem Aufbau besitzen Nectine und Necls große Ähnlichkeiten. So ist ihnen eine extrazelluläre Region mit drei Ig-ähnlichen Domänen, ein Transmembransegment und ein zytoplasmatischer Teil mit verschiedenen konservierten Motiven gemeinsam. Ein großer Unterschied besteht jedoch darin, dass Nectine im Gegensatz zu Necls intrazellulär Afadin binden können [12, 13].

3.1.1 Nectine

Nectine sind zusammen mit den Cadherinen wichtige CAMs und in Verbindung mit ihnen oder unabhängig von ihnen an der Bildung von Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt [14]. Nectine wurden ursprünglich als Rezeptoren für α -Herpesviren isoliert und als *poliovirus receptor-related protein 1* und *2* (PRR1 und PRR2) bezeichnet [15, 16]. Diese erste Gruppe umfasst vier Mitglieder, Nectin 1 bis Nectin 4, und jedes Familienmitglied weist zwei bis drei Splicevarianten auf [12, 13]. Sie enthalten alle, bis auf Nectin 1β , Nectin 3γ und Nectin 4, das konservierte Motiv E/A-X-Y-V an ihrem C-terminus, wobei X irgendeine Aminosäure repräsentiert. Dieses dient als Bindungsmotiv für die *postsynaptic density 95/discs large/zona occludens-1* (PDZ)-Domäne von Afadin, welches die zwei Splicevarianten l-Afadin für *large* und s-Afadin für *small* besitzt [17]. L-Afadin, die längere Splicevariante, stellt das Nectin- und F-Aktin-Bindungsprotein dar und bindet Nectine an das Aktin-Zytoskelett [17, 18]. Obwohl Nectin 4 dieses Motiv fehlt, kann es Afadin am C-Terminus binden [19]. Eine Sonderstellung nimmt Nectin 1γ ein, welchem die Transmembranregion fehlt und es daher als lösliches Protein auftritt [20].

Einige Familienmitglieder können verschiedene zytoplasmatische Proteine zusätzlich zu Afadin binden, z.B. das Zellpolaritätsprotein *partitioning defective 3 homologue* (Par-3) [21], *protein interacting with protein kinase C alpha 1* (PICK1) [22], *multiple PDZ domain protein 1* (MUPP1) [23], *Pals-1 associated*

tight junction protein (PATJ) [23], *membrane palmitoylated protein 3* (MPP3) [24], Zyxin [25] und Willin [26].

3.1.2 Necls

Nectin-ähnliche Proteine sind ubiquitär vorkommende Moleküle mit sehr breit gefächerten Funktionen [27]. Diese Gruppe umfasst fünf Moleküle, Necl-1 bis Necl-5, und grenzt sich von den Nectinen dahingehend ab, dass ihre Mitglieder Afadin nicht binden können [13]. Sie interagieren jedoch mit Gerüstproteinen, wie z.B. mit den Mitgliedern der *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK) Familie MPP3 [28], *protein associated with Lin-7 2* (Pals2) [29] und *calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase* (CASK) [30], sowie Band4.1-Familienmitgliedern, z.B. das Protein *differentially expressed in adenocarcinoma of the lung* (Dal1) [31], oder mit *T-complex-associated-testis-expressed 1* (Tctex-1), einer Untereinheit des Dynein-Motorkomplexes [32]. Auch treten sie in Wechselwirkung mit Nectinen und können so an der Zelladhäsion teilhaben. So ist beispielsweise Necl-5 durch heterophile trans-Interaktion mit Nectin 3 an der Bildung von *Adherens Junctions* beteiligt [33]. In Abbildung 1 sind die strukturellen Unterschiede der Nectine und Necls schematisch dargestellt.

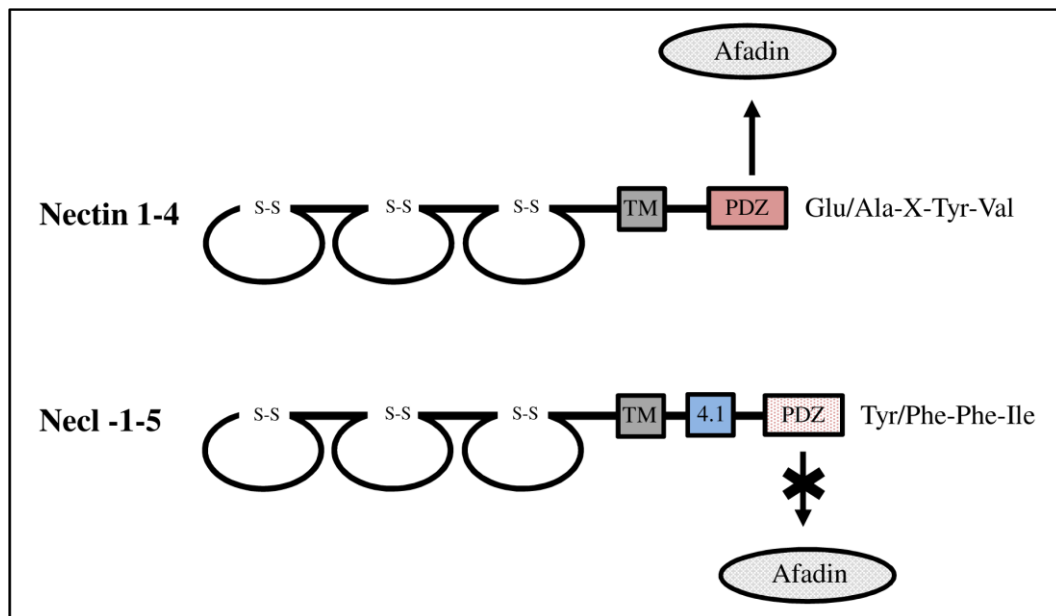


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Nectine und Necls mit jeweils drei Ig-Domänen, welche durch Disulfidbrücken (S-S) stabilisiert sind. Nectine (oben) besitzen ein PDZ-bindendes Motiv, welches mit der PDZ-Domäne von Afadin interagieren kann, wohingegen das PDZ-Motiv der Necls (unten) eine andere Aminosäuresequenz aufweist und eine Interaktion mit dem PDZ-Motiv von Afadin nicht möglich ist. Vielmehr assoziieren sie mit Mitgliedern der MAGUK Familie. Necls weisen zusätzlich ein 4.1-Bindungsmotiv auf, durch welches sie mit Mitgliedern der 4.1-Familie von Proteinen interagieren. TM stellt die Transmembrandomäne dar. Abbildung modifiziert nach Fuchs *et al.*[8]

3.1.3 Funktionen

Nectine regulieren die Formation von verschiedensten Zell-Zell-Verbindungen, wie z.B. *Adherens Junctions* zwischen benachbarten epithelialen Zellen und Fibroblasten [13, 14], Sertolizell-Spermatid-Verbindungen im Hoden [34-36], *Puncta Adherentia Junctions* im Nervensystem [37] und Zellverbindungen im Ziliarkörper [38]. Neben den Aufgaben bei der Zelladhäsion regulieren Nectine und Necls eine Reihe wichtiger zellulärer Funktionen, bei denen im Folgenden einige herausgegriffen werden sollen.

Nectine und Necls sind beteiligt an der Zellproliferation und Zellbewegung [39, 40], sowie Zelldifferenzierung [41]. Sie sind auch involviert in den Aufbau von apikal-basaler Polarität an Zell-Zell-Adhäsionsstellen [42, 43] und die Formation von *Tight Junctions* in Epithelzellen [44, 45]. Des Weiteren sind sie wichtig für das Zellüberleben und weisen einen anti-apoptotischen Effekt auf [46]. Im Nervensystem mediierten einige Vertreter axo-gliale Interaktionen, Schwannzell-Differenzierung und Myelinisierung [30, 47, 48].

Einige Mitglieder fungieren als Eintrittspforte für virale Erreger, so stellen Nectin

1 α und Nectin 2 α Rezeptoren für Herpesviren dar [15, 16], Nectin 4 interagiert mit dem Masernvirus [49] und Necl-5 vermittelt Interaktion mit Polioviren [50].

Viele Tumorzellen exprimieren erhöhtes Level von Nectinen und Necls, wodurch diese Proteine einen Vorteil für Wachstum, Verteilung und Metastasierung von Tumorzellen darstellen könnten [51, 52].

Zusammenfassend sind die Mitglieder der Nectin und Necl-Familie mit Interaktionspartnern und Funktionen in der Tabelle 1 eingetragen.

Mitglied	Interaktion mit	Funktionen
Nectin 1 <i>PRR1, PVRL1, CD111</i>	Nectin 1, Nectin 3, Nectin 4, Necl-1, CD96, HSV	<ul style="list-style-type: none"> • Zelladhäsion • Zelldifferenzierung • Rezeptor für Herpes simplex Virus (HSV)
Nectin 2 <i>PRR2, PVRL2, CD112</i>	Nectin 2, Nectin 3, CD226, TIGIT, HSV	<ul style="list-style-type: none"> • Zelladhäsion • Rezeptor für HSV
Nectin 3 <i>PRR3, PVRL3, CD113</i>	Nectin 1, Nectin 2, Nectin 3, Necl-1, Necl-2, Necl-5	<ul style="list-style-type: none"> • Zelladhäsion • Zellbewegung • anti-apoptotischer Effekt
Nectin 4 <i>PRR4, PVRL4</i>	Nectin 1, Nectin 4, MV	<ul style="list-style-type: none"> • Zelladhäsion • Marker für Brustkarzinom • Rezeptor für Masernvirus (MV)
Necl-1 <i>CADM3, TSLL1, IGSF4B, synCAM3</i>	Nectin 1, Nectin 3, Necl-1, Necl-2, Necl-3, Necl-4	<ul style="list-style-type: none"> • Zelladhäsion im Nervengewebe • mediiert axo-gliale Interaktion, Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung
Necl-2 <i>CADM1, IGSF4, TSLC1, sgIGSF, synCAM1</i>	Nectin 3, Necl-1, Necl-2, CRTAM	<ul style="list-style-type: none"> • Zelladhäsion • lokalisiert in der basolateralen Membran von Epithelzellen • Tumorsuppressor • Mediator der Tumorüberwachung
Necl-3 <i>CADM2, IGSF4D, synCAM2</i>	Necl-1	<ul style="list-style-type: none"> • Funktion noch unbekannt
Necl-4 <i>CADM4, TSLL2, IGSF4C, synCAM4</i>	Necl-1	<ul style="list-style-type: none"> • Zelladhäsion im Nervengewebe • mediiert axo-gliale Interaktion, Schwannzellendifferenzierung und Myelinisierung • möglicherweise in Tumorsuppression involviert
Necl-5 <i>PVR, CD155, TAGE4</i>	Nectin 3, TIGIT, CD226, CD96, PV	<ul style="list-style-type: none"> • Rezeptor für Poliovirus (PV) • Überexpression in vielen Karzinomen • erhöht Zellbewegung und Zellproliferation

Tabelle. 1: Mitglieder der Nectin und Necl-Familie mit alternativen Bezeichnungen, Interaktionspartnern und Funktionen. TAGE4: *tumor associated glycoprotein E4*, TSLL: *tumor suppressor in lung cancer like*, IGSF: *immunoglobulin superfamily*; Tabelle modifiziert nach Takai *et al.* [27]

3.1.4 Bindung und Bindungspartner

Zwei Nectin und Necl-Moleküle auf der Oberfläche derselben Zelle formen zuerst cis-Homodimere, welche dann seitliche Cluster bilden [53, 54]. Diese können dann in trans mit den Clustern auf der entgegengesetzten Zellseite interagieren. Dabei scheint die V-Domäne für die Formation von cis- und trans-Dimeren verantwortlich zu sein [53]. Auf diese Weise können die Familienmitglieder sowohl homophil mit dem gleichen Mitglied, als auch heterophil mit anderen Familienmitgliedern interagieren, wobei letztere Interaktionen stärkere Bindungen hervorrufen [54]. Zusätzlich können sie aber auch trans-Verbindungen mit Molekülen außerhalb der Nectin und Necl-Familie eingehen [7, 8]. Dabei stellen trans-Interaktionen außerhalb der Nectin und Necl-Familie solche mit anderen Ig-ähnlichen Transmembranproteinen dar, wie z.B. den nachfolgend beschriebenen Molekülen *T cell activation, increased late expression* (Tactile, CD96) [55], *DNAX accessory molecule 1* (DNAM1, CD226) [56], TIGIT [57] und CRTAM [9-11] (Abbildung 2).

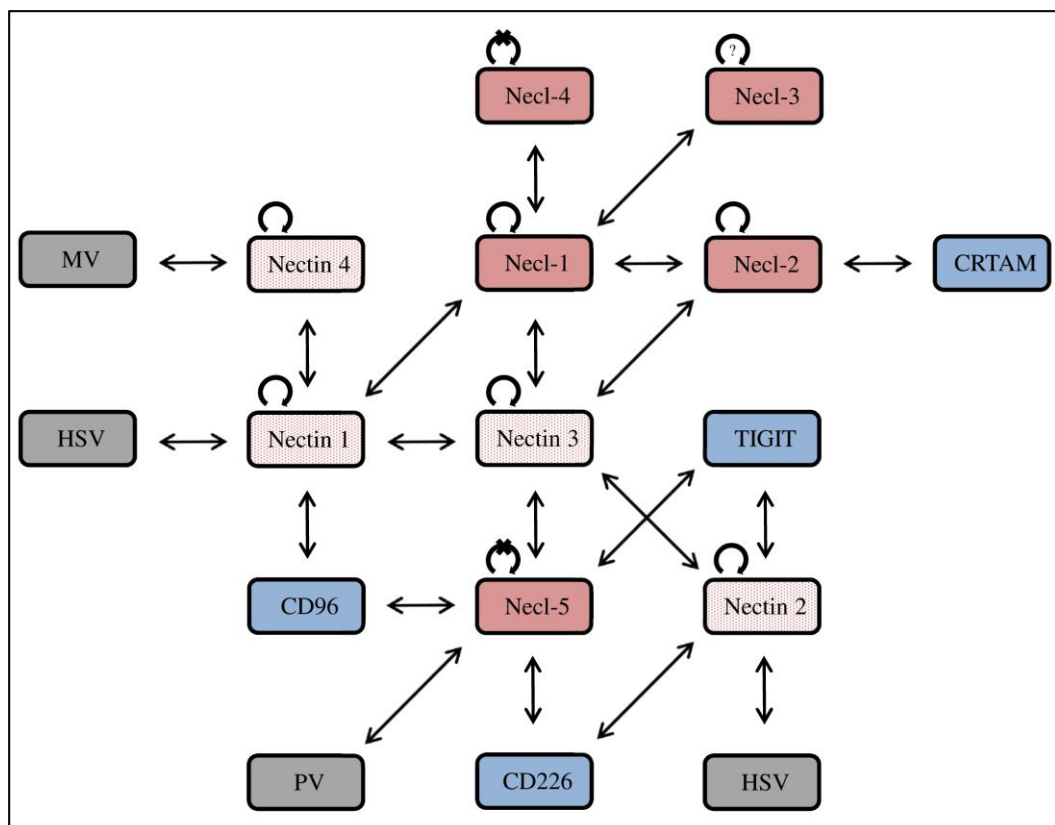


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktionspartner von Nectinen und Neclns. Die rotierenden Pfeile zeigen an, dass der jeweilige Vertreter homophile Interaktionen eingehen kann, der durchgestrichene rotierende Pfeil, dass nur heterophile Interaktionen möglich sind. Abbildung modifiziert nach Rikitake *et al.* [58]

3.2 Ig-ähnliche Rezeptoren die an Nectine und Necls binden

Eine Gruppe von Rezeptoren, die in den letzten Jahren intensiv studiert wurde, zählt ebenfalls zur Ig-Superfamilie und beinhaltet Bindungspartner der vorher beschriebenen Nectine und Necls. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie sowohl auf CD8 positiven T-Zellen als auch auf Natürlichen Killer (NK)-Zellen exprimiert werden und an der Vermittlung von Effektorfunktionen dieser Zelltypen beteiligt sind [7, 8]. Zu dieser Gruppe zählen CD96, TIGIT, CD226 und CRTAM, auf welche nachfolgend näher eingegangen werden soll.

3.2.1 CD96

Ursprünglich wurde CD96 als T-Zell-spezifischer Rezeptor identifiziert, und erhielt die Bezeichnung Tactile für *T cell activation, increased late expression* [59]. Dieses Molekül ist beim Menschen auf Chromosom 3 und bei der Maus auf Chromosom 16 kodiert und besitzt als Mitglied der Ig-Superfamilie drei Ig-Domänen [59]. Dem zytoplasmatischen Teil fehlen typische Motive für das *downstream signalling* [59], aber er enthält ein ITIM-Motiv [55]. CD96 zeigt Sequenzähnlichkeiten mit CD226 [60], *Drosophila amalgam*, dem Melanom-Antigen *Mucin-18* (MUC-18), Mitglieder der *carcinoembryonic antigen* (CEA) Familie, Necl-5 und dem *neural cell adhesion molecule* (NCAM) [59].

Beim Menschen ist die Expression weitgehend beschränkt auf NK-Zellen, T-Zellen und einige B-Zellen. Während die Expression auf naiven T-Zellen und NK-Zellen gering ist, wird sie nach Zellaktivierung jedoch stark hochreguliert [59].

Die Rolle von CD96 im Immungeschehen ist noch nicht geklärt. Aufgrund der ITIM-Sequenz könnte dieser Rezeptor eine inhibitorische Funktion besitzen. Es wurde jedoch gezeigt, dass CD96 die Bindung von NK-Zellen an Necl-5 exprimierende Zielzellen fördert und die Zytotoxizität von aktivierten NK-Zellen stimuliert. Dieser Effekt war allerdings weniger effizient als bei anderen Rezeptoren wie z.B. bei CD226 [55]. Andere Berichte haben herausgestellt, dass CD96 ein wichtiger Marker für akute Myeloische Leukämie ist und dass Mutationen in diesem Rezeptor eine Form des Opitz Trigonoccephalie Syndroms bedingen [61, 62]. Eine neuere Studie weist auf die Funktion von CD96 während der Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV1) Infektion hin. Dabei scheint die Abnahme der CD96 Expression auf CD8 positiven Zellen den Verlauf der HIV1 Pathogenese zu beeinflussen und könnte darauf hindeuten, dass CD96

möglicherweise das Fortschreiten einer HIV1 Erkrankung beeinträchtigt [63]. Bei der Maus ist Nectin 1 als zusätzlicher Ligand für diesen Rezeptor bekannt [64].

3.2.2 CD226

Ein weiteres Mitglied der Ig-Superfamilie von Rezeptoren, welches an Vertreter der Nectin und Necl-Familie bindet, ist CD226, ein transmembranöses Glykoprotein mit zwei extrazellulären Ig-Domänen [60, 65]. Das Gen ist lokalisiert auf dem humanen und murinen Chromosom 18q22.3 [60, 65]. Ursprünglich wurde dieses Molekül als *T lineage-specific activation antigen 1* (TLiSA1) beschrieben, ein Marker involviert in die Differenzierung von CD8 positiven T-Zellen [66]. Später wurde ihm zusätzlich eine Rolle in der Aktivierung von Blutplättchen zugesprochen und es wurde in PTA1 für *platelet and T cell activation antigen 1* umbenannt [67]. Nachfolgend wurde die Bezeichnung *DNAX accessory molecule 1* (DNAM-1) vorgeschlagen, da CD226 als ein signaltransduzierendes Adhäsionsmolekül und ein Rezeptor, involviert in die CD8 positive T-Zell und NK-Zell medierte Zytotoxizität, charakterisiert wurde. [60].

Dieses Molekül wird auf einem Großteil der NK-Zellen, auf T-Zellen, auf einem Teil der B-Zellen und auf Monozyten in Mensch und Maus exprimiert [60, 68].

CD226 bindet zwei verschiedene Zelloberflächenliganden, *poliovirus receptor* (PVR, Necl-5, CD115) und *poliovirus receptor-related 2* (PVRL 2, Nectin 2) [56, 69]. Die Interaktion von CD226 auf CD8 positiven T-Zellen oder NK-Zellen und ihren Liganden auf Zielzellen induziert zellvermittelte Zytotoxizität *in vivo* und *in vitro* [69, 70].

Nach Rezeptorbindung wird das Serin³²⁹ von CD226 durch die Protein-Kinase C phosphoryliert, was einen wichtigen Schritt für die Zellsignalweiterleitung und die Zelladhäsion darstellt [65]. Die Initialisierung der Zytotoxizität durch Kreuzvernetzung von CD226 ist abhängig von einer funktionellen Interaktion mit dem *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) [71]. LFA-1 assoziiert mit CD226 auf NK-Zellen und aktivierten T-Zellen, wobei die Serin-Phosphorylierung von CD226 eine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren führt die Kreuzvernetzung dieser beiden Moleküle zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von CD226 durch die Protein Kinase Fyn, welche durch LFA-1 aktiviert wird. CD226 ist somit involviert in die LFA-1 medierte intrazelluläre Signalwege zur Auslösung von T-Zell-Differenzierung und T-Zell-Proliferation [71, 72]. Der

zytoplasmatische Anteil von CD226 enthält Bindungsmotive für Mitglieder der 4.1 Familie von Proteinen und für Mitglieder der MAGUK Familie. Diese Proteine binden den CD226 Rezeptor an das Aktin-Zytoskelett und fördern womöglich das Clustering von CD226 mit LFA-1 [73]. Bei Monozyten und eventuell auch anderen Immunzellen spielt CD226 eine Rolle bei transendothelialer Migration, wobei es durch die Interaktion mit Necl-5, welches unter anderem an den endothelialen Zellverbindungen exprimiert wird, die Migration durch diese Zellverbindungen während des Diapedeseschrittes erleichtert [74]. Auch ist CD226 an der CD4 T-Helferzell-Differenzierung beteiligt [72, 75]. Eine wichtige Funktion von CD226 ist außerdem die Erhöhung der zytotoxischen Effektorfunktionen von CD8 Zellen und NK-Zellen gegen Tumoren und virusinfizierte Zellen [76, 77]. Dieses Molekül ist an der NK-Zell mediierten Tumorüberwachung beteiligt. NK-Zellen benötigen CD226 für die Elimination von Tumorzellen, da diese durch die niedrige Expression von Liganden für andere aktivierende NK-Zell-Rezeptoren weniger anfällig für Zytotoxizität sind [78]. Auch agiert CD226 als kostimulatorisches Molekül zur Aktivierung von CD8 positiven T-Zellen und NK-Zellen durch nichtprofessionelle Antigenpräsentierende Zellen (APC für *antigen presenting cell*) und Tumoren mit niedriger Immunogenität [78].

Diese Funktionen heben die wichtige Rolle von CD226 beim Vermitteln einer CD8 T-Zell- und NK-Zell-Antwort hervor, wo Tumoren und/oder virusinfizierte Zellen andere wichtige kostimulatorische Moleküle, z.B. Mitglieder der B7 Familie, herunterreguliert haben [7].

Die klinische Relevanz von CD226 wurde anhand einer Reihe von Studien aufgezeigt. Beispielsweise wurde dargelegt, dass CD226 zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR für *T cell receptor*) in die Erkennung und Elimination von „Akuter Myeloischer Leukämie Blasten“ durch V γ 9V δ 2 T-Zellen beteiligt ist [79]. V γ 9V δ 2 T-Zellen sind mit einem Anteil von 1-10 % im Menschen die Hauptgruppe von zirkulierenden $\gamma\delta$ T-Zellen. Sie können phosphorylierte nicht-Peptidantigene, welche auf Zellen exprimiert werden, die eine neoplastische Transformation durchmachen, erkennen und diese Zellen dann abtöten [80, 81].

3.2.3 TIGIT

TIGIT ist die Kurzbezeichnung für *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* und, wie der Name schon andeutet, ein weiteres Mitglied der

Ig-Superfamilie [82]. Auch WUCAM, für *Washington University cell adhesion molecule* [83] und *V-set and transmembrane domain-containing protein 3* (VSTM3) [84] sind gängige Bezeichnungen für dieses Transmembranprotein.

Strukturell setzt sich TIGIT aus einer extrazellulären variablen Ig-ähnlichen Domäne, einer Typ-I Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil mit zwei Tyrosinen, von denen eines zu einem ITIM gehört, zusammen [82, 83].

Die Expression beschränkt sich auf NK-Zellen und T-Zellen und bei letzteren hauptsächlich auf T-Gedächtniszellen, Follikulären T-Helferzellen und Regulatorischen T-Zellen und wird nach T-Zell-Aktivierung transient hochreguliert [82-84].

Bis jetzt sind zwei Bindungspartner bekannt, Necl-5 und Nectin 2, welche auf Dendritischen Zellen (DC für *dendritic cell*) exprimiert werden [57, 82]. TIGIT stellt ein Protein dar, dessen Genstruktur der von anderen Mitgliedern der CD28 Familie entspricht und kann daher der CD28 Familie zugeordnet werden [84]. Mitglieder der B7-CD28 Familie von Proteinen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von T-Zell-Funktionen [85], so anscheinend auch TIGIT, da gezeigt werden konnte, dass lösliches TIGIT die T-Zell-Antwort *in vivo* und *in vitro* abschwächt [84]. Zudem wurde nachgewiesen, dass TIGIT Knockout-Mäuse sehr anfällig für Autoimmungeschehen sind, was schlussfolgern lässt, dass TIGIT ein wichtiger Regulator der T-Zell-Antwort ist [84]. Dabei kann TIGIT die T-Zell-Antwort nicht nur indirekt über die Bindung von Necl-5 auf DCs steuern, wodurch es zu einem Abfall der Interleukin (IL)-12 und einem Anstieg der IL-10 Produktion durch DCs kommt [82]. Es kann vielmehr auch direkt, ohne die Hilfe von APCs, die T-Zell-Antwort hemmen, indem es die TCR gesteuerten Aktivierungssignale abschwächt [6, 84], was zu einer verminderten Aktivierung, IL-2 Produktion und TCR medierten Proliferation führt [6]. Des Weiteren kann TIGIT die T-Zell-Aktivierung noch auf einem weiteren Weg direkt hemmen, indem es mit CD226 um denselben Liganden Necl-5 konkurriert [6].

Auf Seiten der NK-Zellen ist bekannt, dass TIGIT, sowohl bei Mensch als auch bei Maus, die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität direkt durch das ITIM hemmt [57, 86]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die Interferon (IFN)- γ Sekretion nach TIGIT-Blockierung erhöht und die TIGIT-vermittelte Inhibition dominant ist gegenüber den Signalen von Necl-5 bindenden kostimulatorischen Rezeptoren wie CD226 [86].

3.2.4 CRTAM

Dieses Molekül wurde erstmals 2000 in einer Studie identifiziert, in welcher Gene charakterisiert werden sollten, die vorwiegend in Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) exprimiert sind. Wegen seinem restringierten Expressionsmuster in NKT-Zellen und CD8 positiven T-Zellen erhielt das Molekül die Bezeichnung CRTAM für *class I restricted T cell associated molecule* [87].

Beim Menschen wird CRTAM auf aktivierten CD8 positiven T Zellen, NK-Zellen und einer kleinen Untergruppe von CD4 positiven T Zellen exprimiert [10, 87].

Als weiteres Mitglied der Ig-Superfamilie besitzt es zwei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen, die membrandistale vom variablen Typ und die membranproximale Domäne vom konstanten Typ [87].

Die Signalwege von CRTAM sind noch weitgehend unbekannt. So findet sich intrazytoplasmatisch kein Afadin-Bindungsmotiv vergleichbar zu dem der Nectine, oder ein Band4.1 Bindungsmotiv wie bei CD226, aber auch keine ITIM-Sequenzen wie bei CD96 und TIGIT. Jedoch weist CRTAM ein Carboxyl-terminales PDZ-Bindungsmotiv auf, welchem es möglich ist, mit der PDZ-Domäne von anderen Proteinen zu interagieren [9].

Das CRTAM Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 11 (11q24.1), bei der Maus auf Chromosom 9 und besteht bei beiden aus 10 Exons.

Bis jetzt wurde nur ein Ligand bei Mensch und Maus beschrieben, Nectin-like Protein 2 (Nect-2), auch bekannt als *cell adhesion molecule 1* (CADM1), *immunoglobulin superfamily member 4* (IGSF4), *synaptic cell adhesion molecule 1* (SYNCAM) und *tumor suppressor in lung cancer 1* (TSLC1) [9-11]. Dabei verursacht die Bindung von CRTAM auf aktivierten NK-Zellen und Nect-2 auf der Oberfläche von Tumorzellen erhöhte NK-Zell-Zytotoxizität gegen sonst nur schwach immunogene Ziele [10]. Da Nect-2 unter anderem eine Rolle bei der Metastasierung von verschiedenen Tumorformen zugesprochen wird [51, 52], scheint die Wichtigkeit von CRTAM bei der Tumorüberwachung hochrelevant zu sein [7]. Auf CD8 positiven T-Zellen führt die Kreuzvernetzung von TCR und CRTAM *in vitro* zur erhöhten IFN- γ Ausschüttung [10]. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Nect-2 auf APCs die Sekretion von IL-22 durch CD8 positive Zellen fördert [11], eines T-Zell-Mediators, welcher direkt die nichtspezifische Immunität in Geweben beeinflusst [88]. Auch führt eine Interaktion von CRTAM positiven CD8 T-Zellen mit Nect-2 auf DCs der T-Zell-Zone im Lymphknoten zur Retention von CD8 positiven T-Zellen in einer späten Phase der Aktivierung

noch vor Beginn der Proliferation, was möglicherweise eine effektive Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen in dieser Lokalisation bedingt [89]. Auf aktivierten CD4 positiven T-Zellen unterstützt CRTAM durch Interaktion mit dem Zellpolaritätsprotein Scrib die Adhäsion und Ausbildung einer späten Phase der Zellpolarität. Die Aufrechterhaltung dieser Zellpolarität führt zur Produktion von IFN- γ und IL-22 und könnte daher die TH1 und TH17 Antwort beeinflussen [90].

Erst kürzlich wurde in einer Studie die Rolle der CRTAM Expression auf aktivierten V γ 9V δ 2 T-Zellen nach TCR-Bindung herausgearbeitet. Obwohl die Bindung von Necl-2 an CRTAM auf diesen Zellen weder Zytotoxizität noch IFN- γ Ausschüttung bedingt, führte die Interaktion von CRTAM mit Necl-2-exprimierenden Tumorzellen zur Herunterregulierung von CRTAM und zum Zelltod der V γ 9V δ 2 T-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen die Beteiligung von CRTAM am Überleben der aktivierten V γ 9V δ 2 T-Zellen auf und geben Hinweise darauf, dass Necl-2 auf Tumorzellen einen neuen Angriffspunkt der Antitumorthherapie darstellen könnte [91].

Neben diesen wichtigen Funktionen im Immungeschehen beteiligt sich CRTAM durch seine Expression auf Epithelzellen an der Ausbildung von Zell-Zell-Interaktionen und stellt daher ein bedeutendes Molekül in der epithelialen Zelladhäsion dar [92]. Wegen seiner Expression in Purkinje-Neuronen des Kleinhirns wird diskutiert, ob CRTAM durch Bindung an Necl-2 im Gehirn zu neuronalen Interaktionen beiträgt [93].

In Abbildung 3 sind die strukturellen Merkmale von CRTAM und seinen Gruppenmitgliedern schematisch dargestellt.

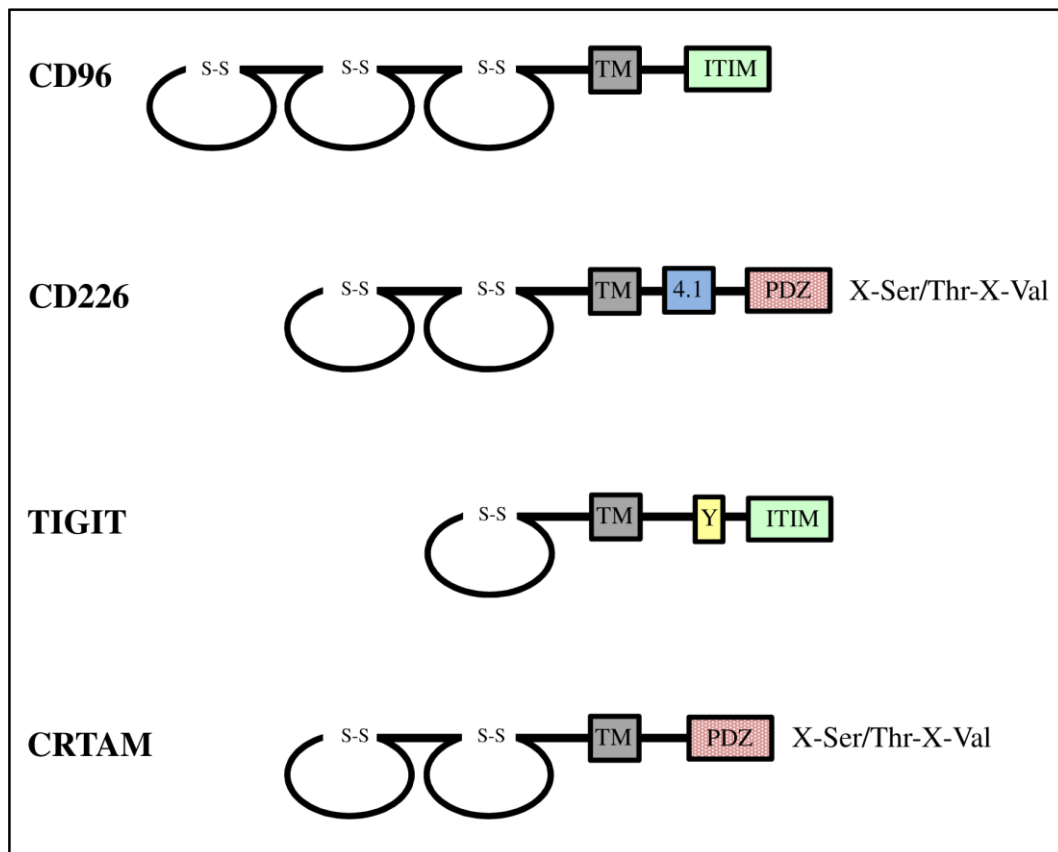


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ig-Superfamilienmitglieder, die an Nectine und Necls binden. Die Anzahl der Ig-Domänen der jeweiligen Vertreter, welche durch Disulfidbrücken (S-S) stabilisiert sind, ist eingezeichnet. CD96 und TIGIT besitzen ein ITIM-Motiv, TIGIT noch ein zusätzliches Tyrosin (Y), in ihrem zytoplasmatischen Anteil und wirken dadurch potentiell hemmend. CRTAM besitzt ein PDZ-bindendes Motiv und CD226 zusätzlich dazu ein 4.1-Bindungsmotiv. Abbildung modifiziert nach Fuchs *et al.* [8]

3.3 CRTAM beim Huhn

Beim Huhn wurde CRTAM erstmals im Jahr 2000 beschrieben und als neues Mitglied der Ig-Superfamilie charakterisiert [94]. Wegen seiner schnellen und gewebe-spezifischen Expression in aktivierten Thymozyten, Milzlymphozyten und in embryonalen Thymozyten führte man die Bezeichnung *cTADS* für *chicken thymic activation and developmental sequence* ein.

Die Sequenz zeigt ein Protein von 439 Aminosäuren Länge an. Es ist gegliedert in einen extrazellulären Bereich mit zwei Ig-ähnlichen Domänen, eine Typ-I Transmembranregion und eine kurze zytoplasmatische Domäne. *cTADS* mRNA konnte nicht in unaktivierten Thymus-, Milz- oder Bursazellen gefunden werden, jedoch in Milz- und Thymuszellen nach Zellaktivierung und zusätzlich in embryonalen Thymozyten [94].

Die Expression von cTADS in embryonalem Thymus war dabei beschränkt auf drei ausgeprägte Peaks zu Zeitpunkten, welche mit der klonalen Expansion von TCR-1, -2 und -3 exprimierenden Zellen einhergehen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass cTADS in allen drei Untergruppen von Hühner-Thymozyten exprimiert sein könnte und es möglicherweise in die Prozess der klonalen T-Zell-Expansion involviert ist [94].

4 PUBLIKATION

Chicken CRTAM binds nectin-like 2 ligand and is upregulated on CD8⁺ αβ and γδ T lymphocytes with different kinetics

Maria Zechmann^a, Sven Reese^b, Thomas W. Göbel^{a*}

^aInstitute for Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Munich, Germany; ^bInstitute for Anatomy, Histology and Embryology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Munich, Germany

* Corresponding author: Tel.: +49 89 2180 3827; fax: +49 89 2180 2552;

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

Abstract

During a search for immunomodulatory receptors in the chicken genome, we identified a previously cloned chicken sequence as CRTAM homologue by its overall identity and several conserved sequence features. For further characterization, we generated a CRTAM specific mab. No staining was detectable in freshly isolated cell preparations from thymus, bursa, caecal tonsils, spleen, blood and intestine. Activation of splenocytes with recombinant IL-2 increased rapid CRTAM expression within a 2 h period on about 30% of the cells. These CRTAM⁺ cells were identified as CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes. In contrast, CRTAM expression could not be stimulated on PBL with IL-2, even within a 48 h stimulation period. As a second means of activation, T cell receptor (TCR) crosslinking using an anti- $\alpha\beta$ -TCR induced CRTAM on both PBL and splenocytes. While CRTAM expression was again rapidly upregulated on splenocytes within 2 h, it took 48 h to reach maximum levels of CRTAM expression in PBL. Strikingly, albeit the stimulation of splenocytes was performed with anti- $\alpha\beta$ -TCR, CRTAM expression after 2 h was mainly restricted to CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes, however, the longer anti-TCR stimulation of peripheral blood lymphocytes (PBL) resulted in CRTAM expression on $\alpha\beta$ T lymphocytes. In order to characterize the potential ligand we cloned and expressed chicken Necl-2, a member of the nectin and nectin-like family which is highly homologous to its mammalian counterpart. Three independent assays including a reporter assay, staining with a CRTAM-Ig fusion protein and a cell conjugate assay confirmed the interaction of CRTAM with Necl-2 which could also be blocked by a soluble CRTAM-Ig fusion protein or a CRTAM specific mab. These results suggest that chicken CRTAM represents an early activation antigen on CD8⁺ T cells which binds to Necl-2 and is upregulated with distinct kinetics on $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T lymphocytes.

Introduction

CD8⁺ T cells and natural killer (NK) cells display a number of receptors that are important in the recognition of target cells. One group of receptors expressed by both cell types belongs to the immunoglobulin superfamily (IgSF) and includes CD226 (DNAM-1), TIGIT (WUCAM), CD96, and CRTAM (CD355) [1,2]. These receptors bind to members of the nectin and nectin-like family, which are IgSF members, too and mediate Ca²⁺ independent homophilic and heterophilic adhesion. They are also important for adhesion between neighboring epithelial cells.

CRTAM was initially identified in a study devised to characterize upregulated genes in NK-T cells and received its name as “class I-restricted T cell-associated molecule” to denote its restricted expression pattern on CD8⁺ T cells. It has been further characterized as an important activation marker for both CD8⁺ T cells and NK-T cells [3]. In man, CRTAM expression is observed on activated CD8⁺ T cells, as well as on natural killer (NK) cells and a small subset of CD4⁺ T cells [3,4]. As a type I transmembrane protein CRTAM is composed of an amino-terminal Ig-like domain of the variable type (V-type), and a membrane proximal Ig-like domain of the constant type 1 (C1-type). Its intracytoplasmic domain contains a carboxyl-terminal class I PSD-95/Disc-large/ZO-1 (PDZ)-binding motif, capable of interacting with PDZ domain.

The CRTAM gene is located on human chromosome 11 (11q24.1), whereas the mouse counterpart is located on chromosome 9 (9 21.79 cM), both consisting of 10 exons. Several groups have identified Necl-2 (CADM1, IGSF4, SYNCAM, TSLC1, synCAM1) as a ligand of both murine and human CRTAM [4-7]. Engagement of CRTAM promotes cytotoxic effects of NK cells towards Necl-2 expressing tumor cells. Coligation of TCR and CRTAM on CD8 positive T cells causes interferon- γ (IFN- γ) secretion in vitro [4].

Recently, a study highlighted the role of CRTAM expression on V γ 9V δ 2 T cells after TCR triggering. Although this T cell subpopulation exerted neither cytotoxicity nor cytokine secretion, an interaction of CRTAM on these cells with Necl-2 bearing tumor cells induced CRTAM down regulation and cell death of the V γ 9V δ 2 T cells, thus revealing the CRTAM involvement in the survival of activated V γ 9V δ 2 T cells [8].

Aside from the presence on cells of the immune system and its immunological functions, CRTAM is also involved in cell-cell adhesion due to its expression in

epithelial cells [7] and has a role in the transcytosis of neural stem cells across brain vascular endothelial cells [9].

In 2000, a novel chicken receptor was characterized as member of the IgSF [10]. Since mRNA could only be detected in mitogen-treated thymic and splenic cells as well as in embryonic cells at developmental time points known for T cell clonal expansion it was designated as cTADS (chicken thymic activation and developmental sequence).

The characterization of IgSF families in the chicken with immunomodulatory capacity has been instrumental to gain novel insights into the phylogeny, tissue distribution and function of various IgSF immune receptors [11-13]. Therefore, during an attempt to find additional families, sequence analyses revealed that cTADS is the chicken CRTAM homologue. We now demonstrate using a novel CRTAM specific mab that avian CRTAM expression is restricted to activated CD8⁺ T cells. Although absent from resting cells, stimulation with IL-2 or anti- α V β 1-TCR leads to a rapid CRTAM upregulation on CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells and at later time points on $\alpha\beta$ T cells. Furthermore, we were able to characterize Necl-2 as a ligand for chicken CRTAM. These results point to an important function of CRTAM especially on $\gamma\delta$ T cells, a close interaction of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells during activation and they finally provide evidence for the high phylogenetic conservation of the adhesion receptor family on lymphocytes that binds to nectins.

Materials and Methods

Ethics Statement

All of the experimental procedures were in accordance with institutional, state and federal guidelines on animal welfare. The animal experiments were approved by the committee for the Care and Use of Laboratory animals of the Government of Upper Bavaria, Germany (permit number: 55.2-1-54-2531.6-12.09) and all efforts were made to minimize animal suffering during work.

Animals

Fertilized eggs of chicken line M11, provided by S. Weigend, Federal Agricultural Research Center, Mariensee, Germany, were hatched at the Institute for Animal Physiology, University of Munich. The birds were raised under conventional conditions and used for experiments at the age of 8-16 weeks. Balb/c mice were purchased from Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Germany).

Cloning procedures and sequence analysis

The chicken thymic activation and developmental sequence (cTADS) was originally described in a previous study [10] and will be named CRTAM throughout the paper. For the generation of the constructs, PCR primers for amplification were designed based on the CRTAM and Necl-2 sequence (CRTAM: accession no. NM_001030347.1, Necl-2: accession number XM_417901.3; Table 1). The primers were flanked by sequences recognizing residues of the respective cloning vectors to allow cloning with overlapping ends using the Gibson Assembly™ Master Mix. (New England Biolabs, Ipswich, USA). As templates for CRTAM and Necl-2 amplification, cDNA derived from a chicken thymic cell line (T1-6G5) and chicken brain was used, respectively.

After purification with Wizard®SV Gel and PCR Clean-up system (Promega, Mannheim, Germany), the PCR products were linked to a modified pcDNA3.1/V5-His Topo Vector (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) containing a N-terminal FLAG epitope tag, the transmembrane domain of chicken CD8 α and the cytoplasmic domain of murine CD3 ζ [14,15] using the Gibson Assembly™ Master Mix. In order to generate a soluble CRTAM-Ig fusion protein the primers were generated to amplify the CRTAM extracellular region with overlapping sequences to a vector containing the human Ig signal peptide and the C_H2, C_H3 domain of human IgG1 [16] using the Gibson Assembly. All constructs were

verified by sequencing (GATC, Konstanz, Germany). The Lasergene software package was used for sequence analyses and Mega5 [17] for the construction of the phylogenetic tree.

Cell lines, transfection and expression

The chicken CRTAM-FLAG and Necl-2-FLAG constructs were used to establish stable HEK 293 cells and the CRTAM-FLAG was also used to generate a stable BWZ.36 cell line. The human embryonic kidney (HEK) 293 cell line [18] was stably transfected using the Metafectene liposomal transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Biontex, Planegg, Germany) for both CRTAM and Necl-2. After 24 h of incubation (37°C, 5% CO₂) the transfected cells were seeded in a 96-well flat bottom plate and cultured with medium containing 0.8 mg/ml G418 (Biochrom AG, Berlin, Germany) for 2 weeks.

The mouse thymocyte cell line BWZ.36 [19] was stably transfected by electroporation (3x10⁶ cells, 200V with 950 µF capacitance) with the CRTAM-FLAG expression construct.

Transfected cells were plated in a 96-well flat bottom plate and selected in medium containing 0.8 mg/ml G418 (Biochrom AG, Berlin, Germany) for 10 days at 37°C.

Grown single colonies were analyzed by flow cytometry (FACS CantoII, BD, Heidelberg, Germany) for surface expression of the FLAG epitope.

Expression of chicken CRTAM-Ig fusion protein and ELISA

The CRTAM-Ig fusion construct was stably transfected into HEK 293 cells using the Metafectene liposomal transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Biontex, Planegg, Germany). After 24 h of incubation (37°C, 5% CO₂) the transfected cells were seeded in a 96-well flat bottom plate and cultured with medium containing 0.8 mg/ml G418 (Biochrom AG, Berlin, Germany) for 2 weeks. The culture supernatants were analyzed for CRTAM-huIg secretion by sandwich ELISA as described [20]. Soluble CRTAM was then affinity-purified on protein G-coupled Sepharose using standard procedures.

Generation of a monoclonal antibody

For mab generation, Balb/c mice were immunized three times in 3 weeks intervals with 1x10⁷ of the stably CRTAM-FLAG transfected 293 cells. The mab were

produced according to standard methods with the SP2/O myeloma cell line. Hybridoma supernatants were tested by flow cytometry on either CRTAM-FLAG transfected or untransfected BWZ.36 cells as described before [21]. For further characterization of chicken CRTAM, we selected mab 8A10 (IgM).

Cell preparation

Single cell suspensions of bursa, caecal tonsils, spleen and thymus were prepared by passing the organs through a stainless steel mesh. Lymphocytes were obtained from the cell suspensions by density centrifugation on Ficoll-Hypaque (Biochrom, Berlin, Germany). Peripheral blood lymphocytes (PBL) were isolated by slow-speed centrifugation [22]. Intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) from the duodenal loop were prepared as described before [23].

Activation of cells and cell culture

Activated lymphocytes isolated from blood, spleen, thymus and caecal tonsils as well as IEL were generated by cultivation 1×10^7 cells/ml in a 24-well plate with either a 1:1000 dilution of recombinant IL-2 produced in our laboratory [24] or with plate-bound anti-TCR-2 (SouthernBiotech, Birmingham, USA) at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ for different time periods. The cells were cultured with RPMI 1640 medium supplemented with 8% FCS, 2% chicken serum and 1% penicillin/streptomycin at 41°C and analyzed by flow cytometry.

Antibodies and immunofluorescence analysis

Single-cell staining was performed with the 8A10 mab, followed by a goat-anti-mouse IgM-allophycocyanin (APC) conjugate (SouthernBiotech, Birmingham, USA), or with anti-FLAG M2 mab (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), followed by a goat-anti-mouse IgG1 APC (SouthernBiotech, Birmingham, USA) or R phycoerythrin (R-PE) conjugate (SouthernBiotech, Birmingham, USA), respectively. The staining with the CRTAM-huIg fusion protein was followed by a goat-anti-human IgG R-PE conjugate (SouthernBiotech, Birmingham, USA). For double immunofluorescence analysis, the cells were first incubated with a mixture of primary mab, followed by incubation with an APC-conjugated goat-anti-mouse IgM antibody in combination with goat-anti-mouse IgG1 R-PE conjugate (SouthernBiotech, Birmingham, USA). Additional mab used for staining were specific for chicken CD3 (CT3, mouse IgG1) [25], chicken CD4

and CD8 (CT4, mouse IgG1; CT8 mouse, IgG1 [26], Bu-1 (AV20, mouse IgG1) specific for B lymphocytes [27], CD25 (IgG1), the α -chain of the IL-2-receptor, chicken TCR-1 (mouse IgG1) to discriminate the $\gamma\delta$ T cells ($\gamma\delta$ -TCR [28]), and TCR-2 and TCR-3 to distinguish different subsets of $\alpha\beta$ T cells ($\alpha\text{V}\beta 1$ -TCR [29]; $\alpha\text{V}\beta 2$ -TCR [30], both mouse IgG1). For each staining, appropriate isotype matched controls were used.

Dead cells were discriminated by staining with Fixable Viability Dye eFluor® 780 (affymetrix eBioscience, Frankfurt, Germany) or 7-amino-actinomycin D (7 AAD, Sigma-Aldrich, Munich, Germany; 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) and the living cell population was analyzed by flow cytometry (FACS Canto II, Beckton Dickinson, USA) using the BD FACS DIVA 6.1.3 software.

BWZ.36 reporter assay and ELISA

The BWZ.36 cells are stably transfected with a β -galactosidase reporter cassette under the control of the IL-2 promotor containing three NFAT repeats. A construct was generated encoding the extracellular CRTAM domains fused to the CD8 transmembrane domain and the CD3 ζ cytoplasmatic domain, which was used to establish a stable BWZ.36 clone. Upon CRTAM ligation the ITAM of the CD3 ζ cytoplasmatic domain is phosphorylated and activates the NFAT promotor. As a consequence β -galactosidase is induced and can be detected by adding chlorophenolred- β -D-galactopyranosid (CPRG). β -galactosidase has the ability to cleave CPRG into galactose and chlorophenolred, leading to a color change that can be detected and quantified by optical density reading at 575 nm. 24-well cell culture dishes were coated with anti-FLAG mab 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at 4°C over night for a positive control or were left uncoated. Each cell line was plated at a total amount of 1.5×10^5 cells in the dishes and was incubated for 24 h at 37°C. For our binding study, we co-cultivated stably CRTAM-FLAG transfected BWZ.36 reporter cells with the stably Necl-2-FLAG transfected HEK 293 cells. As positive controls, we incubated the CRTAM-FLAG transfected BWZ.36 in the anti-FLAG mab coated wells. As a mock-control, we co-cultivated the stably expressing BWZ.36 reporter cells with a HEK 293 cell line expressing a Necl-2 unrelated molecule to exclude unspecific binding. To verify the specificity of chicken CRTAM to chicken Necl-2 we co-cultivated the Necl-2-FLAG transfected HEK 293 cells with the CRTAM-huIg fusion protein, both pure and in a concentration of 1:10 for 20 minutes to block specific binding sites before

adding the CRTAM-FLAG transfected BWZ.36 cells. After incubation time the cells were lysed and the β -galactosidase activity was measured by using 130 μ l/well CPRG (Roche, Mannheim, Germany) and quantified by optical density reading at 575 nm 18 h after incubation.

Statistical analysis

The data of the BWZ.36 reporter assays is presented as mean value (mean) and standard deviation (SD) and a dependent t-test was employed to assess differences using the IBM SPSS program version 21.0 based on a significance level of 5 %. Furthermore an adjustment for multiple testing was done using the Bonferroni-Holm correction for multiple comparisons. Finally, values of $p < 0.01667$ were considered significant.

Conjugate Assay

Untransfected BWZ.36, mock transfected BWZ.36 and BWZ.36-CRTAM cells were labeled with PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit for 2 minutes (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), whereas 293-Necl-2 cells were labeled with Vybrant® DiD cell-labeling solution (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 5 minutes using standard procedures. After the cells were washed three times, labeled 293-Necl-2 cells ($2,5 \times 10^5$) were mixed with either labeled BWZ.36-CRTAM cells, mock-transfected BWZ.36 cells or untransfected BWZ.36 cells ($2,5 \times 10^5$), spun down and incubated at 37°C for 2 h. The conjugates were washed once and gently resuspended before flow cytometric analysis. For blocking experiments CRTAM transfected BWZ.36 cells or mock-transfected BWZ.36 cells were preincubated with 8A10 mab for 20 min at room temperature.

Results

Identification of chicken CRTAM

In an attempt to identify novel Ig-like receptors with immunomodulatory potential we found a previously cloned gene designated cTADS. The gene is located on a 12.5 kb region of chromosome 24 and is encoded by 12 exons. CRTAM sequences can also be found in other avian species (turkey: Chromosome 26: 3,303,411-3,315,820; 12 exons and an incomplete version in zebra finch: chromosome 24:3450462-3458344:1). As depicted in Fig.1A, cTADS shares significant homology with mammalian CRTAM. It contains two Ig domains in its extracellular region, the first represents a V-type and the second a C-type Ig domain. The linking region between the Ig and transmembrane region is extended with more than 50 additional amino acids present in the chicken and corresponding turkey sequence (Fig. 1A). Analysis of the genomic structure revealed the presence of two additional exons in the avian CRTAM genes, responsible for the extended linking region. The cytoplasmic domain is of equal length and contains a C-terminal PDZ-binding motif (Fig. 1A).

We next constructed a phylogenetic tree with the receptors known to bind to Nectins or Nectin-like proteins. As expected, the homologues of human and mouse CD96, TIGIT and CD226 form closely related pairs. The CRTAM receptors form a distantly related clade, but clearly the chicken CRTAM clusters together with its respective mammalian homologues (Fig. 1B). In conclusion, we have identified the chicken cTADS sequence as CRTAM homologue.

Generation of a chicken CRTAM specific mab that does not react with resting cells

In order to produce a CRTAM specific mab we generated two cell lines with a N-terminal FLAG-tagged CRTAM version that displayed both extracellular Ig domains fused to the chicken CD8 transmembrane and murine CD3 ζ cytoplasmic domains. Following immunization, mab supernatants were evaluated by their binding properties to the stably transfected cell lines in comparison to the positive control FLAG staining and the untransfected controls (Fig. 2A). One mab designated 8A10, which resembles an IgM isotype, was selected for the further studies.

For analyzing the tissue distribution of chicken CRTAM we initially stained cell preparations obtained from thymus, bursa, blood, spleen, caecal tonsils and

intestine with the 8A10 mab, however, we failed to detect CRTAM expression on the cell surface of these freshly isolated cells (Fig. 2B). This indicated that the mab is able to specifically recognize CRTAM on transfected cells, but it either did not stain the antigen on native cells or the molecule was not present on these cells.

CRTAM is transiently expressed on activated cells

Since CRTAM is a receptor known to be upregulated upon activation, we next evaluated if activation of chicken splenocytes would lead to CRTAM expression. Initial experiments were performed with the lectin Concanavalin A, phorbol-myristate-acetate in combination with Ca-ionophore (PMA/Ca-ionophore), recombinant IL-2 and TCR crosslinking (data not shown). While all of the reagents stimulated CRTAM expression, we focused on the latter two reagents due to their superior stimulation of CRTAM.

IL-2 treatment was able to induce splenocyte activation as judged by increasing CD25 expression (Fig. 3A, middle panels). IL-2 also induced a rapid CRTAM upregulation reaching maximum levels as early as 2 h following stimulation and declining constantly thereafter (Fig. 3A upper panels). Identical treatment of PBL, however, did not induce detectable CRTAM expression (Fig. 3B upper panels) although IL-2 caused cellular activation as judged by the increased CD25 expression during the 48 h stimulation period (Fig. 3B, middle panels). When several dilutions of IL-2 were tested (in the range of 1:10 to 1:1000), none of these concentrations were able to induce CRTAM expression (data not shown). Anti-TCR-2 stimulation of splenocytes also induced CRTAM expression after 2 h rapidly declining at later timepoints (Fig. 3A, lower panels). In contrast to the IL-2 stimulation of PBL, that failed to induce detectable CRTAM expression, anti-TCR-2 treatment of PBL resulted in CRTAM expression visible after 6 h and increasing to reach maximum levels at 48 h (Fig. 3B, lower panels).

These results indicate that CRTAM resembles an early activation marker and poses the question what cellular subsets are upregulating CRTAM following activation.

CRTAM is restricted to CD8 positive T cells with distinct kinetics on $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T cells

To determine the cell types that express CRTAM we performed a series of double stainings using stimulated splenocytes and PBL. Following short term IL-2

stimulation of splenocytes, CRTAM was detectable on CD3⁺ T lymphocytes. CRTAM was undetectable on CD4⁺ T cells, in contrast it was present on a subset of CD8⁺ T cells (Fig. 4). By analyzing the distinct T cell subsets as characterized by their TCR usage, it became evident, that CRTAM was upregulated on a $\gamma\delta$ T cell subpopulation, whereas most $\alpha\beta$ T cells did not express CRTAM (Fig. 4). We consistently observed a correlation of TCR and CRTAM expression with those cells expressing high levels of CRTAM also displayed high amounts of TCR on their surface as judged by the fluorescence intensities (Fig. 4).

When similar immunofluorescence analyses were performed with splenocytes activated for 2 h with anti- $\alpha V\beta 1$ -TCR (TCR-2 mab), CRTAM expression was again mainly expressed by a $\gamma\delta$ T cell subset (Fig. 5A). This was surprising since the TCR stimulation was directed against $\alpha\beta$ T cells. Only after 24 h to 48 h stimulation where CRTAM expression already decreased, its expression could also be detected on $\alpha\beta$ T cells (Fig. 5B). Since we have observed different kinetics of anti-TCR stimulation between splenocytes and PBL, we also analyzed the 48 h time point of stimulated PBL. In that case, CRTAM expression was virtually absent from $\gamma\delta$ T cells, but a subset of $\alpha\beta$ T cells co-expressed CRTAM (Fig. 5C). These cells were also CD8⁺. The reexpression of CRTAM following TCR-2 stimulation of splenocytes visible in the time period between 24 h and 48 h (Fig. 3A; increase of 8 to 13%) is due to the simultaneous decrease of CRTAM on $\gamma\delta$ T cells and its increase on $\alpha\beta$ T cells.

In conclusion, depending on the type of stimulation and the cellular source, CRTAM is upregulated on either CD8⁺ $\gamma\delta$ or $\alpha\beta$ T cells, with the interesting observation that stimulation of the $\alpha\beta$ -TCR in splenocytes leads to rapid CRTAM upregulation on $\gamma\delta$ T cells

Identification of the chicken nectin-like 2 molecule

To further explore the chicken CRTAM molecule we wanted to test whether it binds to the same ligand as in mammals, which is the nectin-like 2 protein (Necl-2) [5]. For this purpose, the chicken Necl-2 homologue was identified in the genome database by homology searches and cloned by PCR. Chicken Necl-2 is encoded by 12 exons on chromosome 24: 4,664,469-4,732,605 and shares about 80 % identity to the corresponding human receptor (Fig. 6). Interestingly, as has been observed for the CRTAM gene, there are two additional exons present in the

chicken that code for an extended connecting peptide close to the transmembrane region that is absent from the human sequence (Fig. 6).

As the human counterpart, the intracellular tail of chicken Necl-2 contains a type I PDZ-binding motif (PDZ) characterized by the conserved sequence X/Tyr/Phe/Ile [31] that in humans is able to bind the PDZ motif of members of the MAGUK family, like Pals2 [32], CASK [33] and Dlg3 (MPP3) [34]. Furthermore it also contains a binding motif for band 4.1 family proteins and thereby in humans it is known to recruit the tumor suppressor DAL-1, that connects Necl-2 to the cytoskeleton [35].

Chicken CRTAM binds to Necl-2

In order to study the potential interaction of CRTAM and Necl-2 we performed three independent assays. First we generated a soluble CRTAM protein by fusing the two CRTAM Ig domains to the human C_H2, C_H3 Ig domains. We tested the specific binding of the CRTAM-huIg fusion protein on a HEK 293 cell line stably transfected with the extracellular N-terminal FLAG-tagged domain of Necl-2 and on untransfected HEK 293 cells, respectively (Fig. 7A). Necl-2 was readily detected by anti-FLAG staining on the transfected HEK 293 cells (Fig. 7A, upper panel; MFI of 6885 as compared to MFI of 227 in the control). Next we stained the cells with the CRTAM-huIg fusion protein. As can be observed from Fig. 7A, the fusion protein stained the Necl-2 transfected cells, whereas an irrelevant fusion protein that also contained the human C_H2, C_H3 Ig domains did not react with the Necl-2 transfected cells (Fig. 7A, lower panel; MFI of 1423 as compared to MFI of 225 in the control). In a next step, we verified the binding capacity of chicken CRTAM and chicken Necl-2 employing the CRTAM transfected BWZ.36 cell line in a reporter assay. Since the CRTAM was epitope tagged, anti-FLAG stimulation served as a positive control and resulted in a strong induction of the intracellular NFAT promoter and β -galactosidase activity (Fig. 7B). The BWZ.36-CRTAM transfectants were either incubated with HEK 293 cells expressing an irrelevant receptor as a negative control or with the Necl-2 expressing HEK 293 cells. The Necl-2 expressing cells induced significant higher amounts of β -galactosidase activity as compared to the control (Fig. 7B). This interaction could be blocked by the addition of the soluble CRTAM-Ig fusion protein.

The statistical analysis revealed significant differences ($p < 0,01667$) between all groups except the negative control compared to BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair blocked by CRTAM-huIg and BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair to BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair blocked by 1:10 diluted CRTAM-huIg. As measure of the variability we calculated subject coefficients of variation, which all were $< 10\%$ indicative of a good reproducibility. The calculation of the minimum distance in between the value of the negative control and the value of the BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair is based on the largest statistical variation. As a result we can assign, that the value of the BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair has to exceed the value of the negative control more than 20% to ensure that the ligand binds to the receptor with a certainty of 95%. In this assay the value of BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair exceeds more than 30% compared to the value of the mock-transfected negative control.

In a further experiment we coincubated labeled BWZ.36-CRTAM, or control BWZ.36 cells with 293-Necl-2 cells for 2 h at 37°C and measured the formation of conjugates by flow cytometry (Fig. 7C) We observed abundant conjugate formation between BWZ.36-CRTAM and 293-Necl-2 cells (Fig. 7C, middle panel) but not between untransfected BWZ.36 (Fig. 7C, upper panel) or mock transfected BWZ.36 (data not shown) and 293 Necl-2 cells. Preincubation of BWZ.36-CRTAM cells with 8A10 mab almost completely blocked the conjugate formation (Fig. 7C, lower panel), whereas preincubation of mock transfected BWZ.36 cells with the 8A10 mab did not show any effect (data not shown).

In conclusion, three independent assays have proved the CRTAM - Necl-2 interaction.

Discussion

The chicken cTADS gene was initially identified in 2000 as a novel Ig-like molecule with similarity to several proteins mediating adhesion that is upregulated on activated thymocytes and splenocytes [10]. The mammalian CRTAM gene was identified in 2000, too, thus a direct assignment of CRTAM and cTADS was most likely precluded due to the simultaneous submission [3]. In 2004, a study initiated to establish a link between innate immunity in the urochordate *Ciona intestinalis* and adaptive immunity receptors of the IgSF family pointed out the relationship of mammalian CRTAM and cTADS [36]. It is of interest that CRTAM homologues seem to have distantly related homologues not only in non-mammalian vertebrates but even in *Drosophila*, where the BEAT family shares similar structural features such as an identical domain organization [36]. In *Ciona intestinalis*, an ancestral gene cluster represented on chromosomes 4 and 10 founded four paralogous regions by two whole genome duplications [37]. Comparative studies have identified the chicken chromosomes 1, 4, 24 and 31 as these paralogous regions and indeed several important IgSF families have been located to these chromosomes, such as the CD200 family on chromosome 1, the chicken leucocyte receptor cluster (LRC) on chromosome 31, and CRTAM on chromosome 24 [12,16,38].

It is interesting to note that both chicken Necl-2 and CRTAM have a difference in their genomic organization. There are two additional exons coding for residues located between the membrane proximal Ig domains and the transmembrane domains. It is not evident, why this region has been condensed in the mammalian molecules and what the functional significance of an extended membrane proximal region is. In a recent report, a novel computational method was used to demonstrate the close relationship of CRTAM and the nectin-like family with the conclusion that both receptors belong to the nectin-like family [39]. The finding that both genes share the additional exons in galliformes is supporting this notion. A further unifying theme for CRTAM and other nectins is their expression on leukocytes and on cells of the nervous system such as Purkinje cells in the cerebellum [40]. The analysis of CRTAM expression in the brain goes beyond the scope of this report, but will be examined in future studies. Altogether, CRTAM is a well conserved molecule that serves several functions in the immune and nervous system.

In order to further explore chicken CRTAM on leukocytes we have generated a

specific mab. Our inability to detect CRTAM on freshly isolated cells corresponds well with mammalian data on CRTAM expression. Several activation agents such as mitogens, TCR crosslinking and IL-2 rapidly upregulated chicken CRTAM. One intriguing aspect is the fast CRTAM upregulation within 2 h of IL-2 or TCR stimulation of splenocytes. This is in good agreement with the data reported on the mRNA expression of cTADS [10]. Since mRNA is detectable very early after cellular activation, it is likely to resemble de novo protein biosynthesis of CRTAM rather than surface expression of preformed receptor proteins stored intracellularly as reported for other molecules such as CD300a [41].

Interestingly, this early CRTAM upregulation on splenocytes by IL-2 was mainly detectable on a $\gamma\delta$ T cell subset. IL-2 stimulation of PBL failed to induce CRTAM, although the cytokine was able to activate cells as judged by the increase of CD25 expression. In contrast, TCR crosslinking did induce CRTAM expression on PBL, but at later time points with a maximum after 48 h of stimulation and mainly on $\alpha\beta$ T cells.

Taken together, there are two pronounced differences in CRTAM upregulation between $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T cells: firstly, a rapid upregulation on $\gamma\delta$ T cells upon stimulation and a delayed CRTAM expression on $\alpha\beta$ T cells reaching a maximum within 48 h and secondly an inability of blood derived $\gamma\delta$ T cells to express CRTAM in contrast to splenic $\gamma\delta$ T cells. Splenic and blood derived $\gamma\delta$ T cells also differ in their expression of various other molecules, such that blood $\gamma\delta$ T cells lack CD6 and display only low levels of CD5 [42-44]. Thus, while blood $\gamma\delta$ T cells seem to be refractory to activation, a splenic $\gamma\delta$ T cell subset can be readily activated and CRTAM serves as an early activation antigen on these cells. In this regard it is interesting that another rich source of $\gamma\delta$ T cells is the IEL population, however, we were not able to detect CRTAM on resting or activated IEL. This underscores that IEL harbors yet another $\gamma\delta$ T cell subset, that is also defined by its unique expression of CD8 $\alpha\alpha$ homodimers instead of CD8 $\alpha\beta$ heterodimers [45].

Mammalian CRTAM is also detectable on NK cells. In the adult chicken, NK cell frequencies are either low or undetectable in several tissues such as PBL or spleen, but the intestinal epithelium harbors a high frequency of NK cells [46,47]. This IEL population did not express CRTAM whether on the resting cell population, nor were we able to increase CRTAM expression upon stimulation of IEL with either IL-2, TCR-2 crosslinking, or PMA/Ca-ionophore (data not

shown).

A further interesting result of our study is the early upregulation of CRTAM on $\gamma\delta$ T cells following stimulation of $\alpha\beta$ T cells with TCR crosslinking. We can exclude a direct stimulation, since multiple studies have demonstrated that the TCR-2 mab is specifically recognizing $\alpha V\beta 1$ T cells. For instance, staining with the TCR-1 and TCR-2 mab detects non-overlapping T cell subsets [48] and immunoprecipitation with these mab also shows distinct biochemical features [49]. Therefore it could be speculated, that stimulation of $\alpha\beta$ T cells leads to either a cognate or non-cognate interaction of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells that induces CRTAM on $\gamma\delta$ T cells. IL-2 secreted by $\alpha\beta$ T cells may well be involved in this process, since IL-2 by itself causes CRTAM expression on $\gamma\delta$ T cells. This observation is in line with earlier reports showing that $\gamma\delta$ T cells in the chicken require either $\alpha\beta$ T cells or exogenous cytokines as growth promoting factors [50]. Since assays for the detection of chicken IL-2 are not available, we performed an IL-2 specific PCR on either resting or TCR-2 stimulated splenocytes. In this experiment a strong upregulation of IL-2 mRNA is observed (Fig. S1, Text S1). The mechanism of CRTAM induction on $\gamma\delta$ T cells following TCR-2 crosslinking needs to be studied in greater detail in future experiments. This will also include an analysis of CD25 expression on resting chicken T cells, which has so far not been performed comprehensively.

We have also been able to confirm Necl-2 as ligand for CRTAM. In mammals, Necl-2 is expressed on the basolateral membrane of epithelial cells and on certain tumor cells [2,7]. The interaction of CRTAM and Necl-2 leads to IFN- γ secretion and T cell stimulation as well as secretion of IL-22 [2]. It will be of importance to clarify if similar reactions can be induced in the chicken. Likewise, the recent observation that CRTAM engagement on V $\gamma 9$ V $\delta 2$ T cells triggers cell death of $\gamma\delta$ T cells could indicate that the upregulation of CRTAM on splenic $\gamma\delta$ T cells in the chicken is a sign of terminal differentiation that may finally result in apoptosis if CRTAM binds to Necl-2 [8].

In conclusion, this characterization of chicken CRTAM expression revealed that CRTAM belongs to a highly conserved receptor family interacting with nectins and that it resembles an activation antigen differentially regulated on splenic versus blood $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells.

Acknowledgments

We would like to thank B. Sperling, B. Schaerer and M. Kohn for expert technical assistance and PD Dr. S. Härtle for continuous support during cytometric analyses.

References

1. Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ (2012) Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 24: 246-251.
2. Fuchs A, Colonna M (2006) The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin Cancer Biol* 16: 359-366.
3. Kennedy J, Vicari AP, Saylor V, Zurawski SM, Copeland NG, et al. (2000) A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leukoc Biol* 67: 725-734.
4. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M (2005) The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 106: 779-786.
5. Galibert L, Diemer GS, Liu Z, Johnson RS, Smith JL, et al. (2005) Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J Biol Chem* 280: 21955-21964.
6. Arase N, Takeuchi A, Unno M, Hirano S, Yokosuka T, et al. (2005) Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int Immunol* 17: 1227-1237.
7. Garay E, Patino-Lopez G, Islas S, Alarcon L, Canche-Pool E, et al. (2010) CRTAM: A molecule involved in epithelial cell adhesion. *J Cell Biochem* 111: 111-122.
8. Dessarthe B, Thedrez A, Latouche JB, Cabillic F, Drouet A, et al. (2013) CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cells triggers cell death of activated Vgamma9Vdelta2 T cells. *J Immunol* 190: 4868-4876.
9. Diaz-Coranguéz M, Segovia J, Lopez-Ornelas A, Puerta-Guardo H, Ludert J, et al. (2013) Transmigration of neural stem cells across the blood brain barrier induced by glioma cells. *PLoS One* 8: e60655.
10. Ruble DM, Foster DN (2000) Molecular characterization of a new member of the immunoglobulin superfamily that potentially functions in T-cell activation and development. *Immunogenetics* 51: 347-357.
11. Straub C, Neulen ML, Sperling B, Windau K, Zechmann M, et al. (2013) Chicken NK cell receptors. *Dev Comp Immunol*: In Press.

12. Viertlboeck BC, Gobel TW (2011) The chicken leukocyte receptor cluster. *Vet Immunol Immunopathol* 144: 1-10.
13. Viertlboeck BC, Schmitt R, Göbel TW (2006) The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L. *Immunogenetics* 58: 180-190.
14. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Hanczaruk MA, Schmitt R, Du Pasquier L, et al. (2007) The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 11718-11723.
15. Viertlboeck BC, Wortmann A, Schmitt R, Plachy J, Göbel TW (2008) Chicken C-type lectin-like receptor B-NK, expressed on NK and T cell subsets, binds to a ligand on activated splenocytes. *Mol Immunol* 45: 1398-1404.
16. Viertlboeck BC, Habermann FA, Schmitt R, Groenen MA, Du Pasquier L, et al. (2005) The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *J Immunol* 175: 385-393.
17. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731-2739.
18. DuBridgde RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, et al. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379-387.
19. Karttunen J, Shastri N (1991) Measurement of ligand-induced activation in single viable T cells using the lacZ reporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3972-3976.
20. Pürzel J, Schmitt R, Viertlboeck BC, Göbel TW (2009) Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction. *J Immunol* 183: 4554-4559.
21. Viertlboeck BC, Crooijmans RP, Groenen MA, Göbel TW (2004) Chicken Ig-Like Receptor B2, a Member of a Multigene Family, Is Mainly Expressed on B Lymphocytes, Recruits Both Src Homology 2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and Inhibits Proliferation. *J Immunol* 173: 7385-7393.

22. Viertlboeck BC, Göbel TW (2007) Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Vet Immunol Immunopathol* 119: 137-141.
23. Göbel TW (2000) Isolation and analysis of natural killer cells in chickens. *Methods Mol Biol* 121: 337-345.
24. Göbel TW, Schneider K, Schaerer B, Mejri I, Puehler F, et al. (2003) IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species. *J Immunol* 171: 1809-1815.
25. Chen CL, Ager LL, Gartland GL, Cooper MD (1986) Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *J Exp Med* 164: 375-380.
26. Chan MM, Chen CL, Ager LL, Cooper MD (1988) Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J Immunol* 140: 2133-2138.
27. Rothwell CJ, Vervelde L, Davison TF (1996) Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Vet Immunol Immunopathol* 55: 225-234.
28. Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD (1988) A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* 167: 315-322.
29. Cihak J, Ziegler-Heitbrock HW, Trainer H, Schraner I, Merckenschlager M, et al. (1988) Characterization and functional properties of a novel monoclonal antibody which identifies a T cell receptor in chickens. *Eur J Immunol* 18: 533-537.
30. Char D, Sanchez P, Chen CL, Bucy RP, Cooper MD (1990) A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody. *J Immunol* 145: 3547-3555.
31. Hung AY, Sheng M (2002) PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277: 5699-5702.
32. Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, et al. (2003) Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 35421-35427.
33. Biederer T, Sara Y, Mozhayeva M, Atasoy D, Liu X, et al. (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297:

- 1525-1531.
34. Fukuhara H, Masuda M, Yageta M, Fukami T, Kuramochi M, et al. (2003) Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of *Drosophila* tumor suppressor Dlg. *Oncogene* 22: 6160-6165.
 35. Yageta M, Kuramochi M, Masuda M, Fukami T, Fukuhara H, et al. (2002) Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer. *Cancer Res* 62: 5129-5133.
 36. Du Pasquier L (2004) Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *C R Biol* 327: 591-601.
 37. Zucchetti I, De Santis R, Grusea S, Pontarotti P, Du Pasquier L (2009) Origin and evolution of the vertebrate leukocyte receptors: the lesson from tunicates. *Immunogenetics* 61: 463-481.
 38. Viertlboeck BC, Hanczaruk MA, Schmitt FC, Schmitt R, Göbel TW (2008) Characterization of the chicken CD200 receptor family. *Mol Immunol* 45: 2097-2105.
 39. Rubinstein R, Ramagopal UA, Nathenson SG, Almo SC, Fiser A (2013) Functional classification of immune regulatory proteins. *Structure* 21: 766-776.
 40. Patino-Lopez G, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Verge GM, et al. (2006) Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8⁺ T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 171: 145-155.
 41. Alvarez Y, Tang X, Coligan JE, Borrego F (2008) The CD300a (IRp60) inhibitory receptor is rapidly up-regulated on human neutrophils in response to inflammatory stimuli and modulates CD32a (FcγRIIa) mediated signaling. *Mol Immunol* 45: 253-258.
 42. Göbel TW, Chen CH, Cooper MD (1996) Expression of an avian CD6 candidate is restricted to αβ T cells, splenic CD8⁺ γδ T cells and embryonic natural killer cells. *Eur J Immunol* 26: 1743-1747.
 43. Chen CH, Six A, Kubota T, Tsuji S, Kong FK, et al. (1996) T cell receptors and T cell development. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 212: 37-53.
 44. Koskinen R, Gobel TW, Tregaskes CA, Young JR, Vainio O (1998) The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J Immunol* 160:

4943-4950.

45. Tregaskes CA, Kong FK, Paramithiotis E, Chen CL, Ratcliffe MJ, et al. (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.
46. Göbel TW, Kaspers B, Stangassinger M (2001) NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol* 13: 757-762.
47. Rogers SL, Viertlboeck BC, Göbel TW, Kaufman J (2008) Avian NK activities, cells and receptors. *Semin Immunol* 20: 353-360.
48. Chen CL, Cihak J, Losch U, Cooper MD (1988) Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes. *Eur J Immunol* 18: 539-543.
49. Chen CH, Sowder JT, Lahti JM, Cihak J, Losch U, et al. (1989) TCR3: a third T-cell receptor in the chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2351-2355.
50. Kasahara Y, Chen CH, Cooper MD (1993) Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming. *Eur J Immunol* 23: 2230-2236.

Figure 1. Identification of chicken CRTAM.

(A) Ig domains (IgV, IgC1), connecting peptides (CP) and cytoplasmic domains (CY) as well as PDZ-binding motifs (framed) are indicated. The positions of the signal peptides (SP) and the transmembrane domains (TM) are marked by a bar above the sequence. The conserved cysteine residues are marked by asterisks. Exons are numbered according to the genomic structure of the chicken sequence. The alignment was performed separately for the different exons with ClustalW. Identical residues are boxed. (B) In order to delineate the phylogenetic relationships of the chicken and mammalian receptors indicated a neighbor-joining phylogenetic tree was generated using the MEGA5 software. Accession numbers: chicken (gg) CRTAM: NP_001025518.1, turkey (tu) CRTAM: ENSMGAG00000001951, human (hu) CRTAM: NP_062550.2, mouse (mu) CRTAM: NP_062338.3, human CD226: NP_006557.2, mouse CD226: NP_848802.2, human CD96: NP_937839.1, mouse CD96: NP_115854.2, human TIGIT: NP_115854.2, mouse TIGIT: NP_001139797.1.

Figure 2. Generation of a chicken CRTAM specific mab.

(A) Untransfected and CRTAM-FLAG transfected HEK 293 (upper panel) and BWZ.36 cells (lower panel) were stained with either anti-FLAG or 8A10 mab and analyzed by flow cytometry. (B) Freshly isolated cells of indicated tissues were stained with 8A10 mab. One of three independent experiments is shown.

Figure 3. CRTAM expression upon activation.

Either splenocytes (A) or PBL (B) were stimulated with IL-2 (upper and middle panels) or plate bound anti-TCR-2 (lower panels) for the indicated time periods followed by immunofluorescence analysis using 8A10 mab and anti-CD25 mab (middle panels). The markers were set according to isotype matched negative controls and the percentage of positive cells is indicated.

Figure 4. IL-2 stimulation leads to CRTAM upregulation on CD8 positive $\gamma\delta$ T cells.

Splenocytes were stimulated with recombinant IL-2 for 2 h. Different cell subsets were analyzed by staining with CRTAM specific mab 8A10 in combination with mab specific for CD3, CD4, CD8, Bu1, $\gamma\delta$ -TCR, $\alpha V\beta 1$ -TCR and $\alpha V\beta 2$ -TCR as

indicated. The markers were set according to the isotype matched negative controls. The percentage of positive cells is indicated.

Figure 5. CRTAM expression is induced on splenic $\gamma\delta$ T cells and blood $\alpha\beta$ T cells at different time points following TCR-2 stimulation.

Splenocytes (A, B) and PBL (C) were stimulated with plate bound anti-TCR-2 for 2 h (A) and 48 h (B, C) followed by analysis with mab specific for TCR- $\gamma\delta$ or TCR- $\alpha\beta$ 1 in combination with 8A10 mab. The markers were set according to the isotype matched negative controls and the percentage of positive cells is indicated. One of three independent experiments is shown.

Figure 6. Sequence alignment of chicken (gg) and human (hu) Necl-2.

Ig-Domains (Ig1, Ig2, Ig-like), connecting peptide (CP) and cytoplasmic domains (CY) as well as 4.1 (shaded) and PDZ-binding motifs (framed) are indicated. Identical decoration was used as in Fig. 1. Accession numbers: chicken XP_417901, human NP_055148.

Figure 7. Chicken CRTAM binds to Necl-2.

(A) The chicken Necl-2-FLAG transfected HEK 293 cells were stained with either an isotype matched control or anti-FLAG mab (upper panel). The CRTAM-huIg fusion protein was tested on the same cell line (right histogram, lower panel) and compared to a control staining of the Necl-2-FLAG transfected cells with an irrelevant huIg fusion protein (left histogram, lower panel). Mean fluorescence intensity (MFI) is indicated. (B) A reporter assay as described in the methods section was initiated to analyze the binding of CRTAM and Necl-2. Mean \pm SD of twelve independent assays is shown. Lower case letters denote significant differences ($p < 0.01667$) of each denoted group compared with following groups: (a) anti-FLAG positive control ($p < 0,001$), BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair ($p < 0,001$) and BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair blocked with 1:10 diluted CRTAM-huIg ($p < 0,001$), (b) all other treatment groups, (c) BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair blocked with undiluted CRTAM-huIg ($p < 0,001$), (d) BWZ-CRTAM + 293-Necl-2 receptor ligand pair blocked with 1:10 diluted CRTAM-huIg ($p < 0,001$). (C) For conjugate assays, BWZ.36 cells and CRTAM transfected BWZ.36 cells were labeled with PKH67,

whereas 293-Necl-2 cells were labeled with Vybrant® DiD. 293-Necl-2 transfectants only formed conjugates with CRTAM transfected (middle panel) but not with untransfected BWZ.36 cells (upper panel). Preincubation of the CRTAM transfected BWZ.36 cells with 8A10 mab prior to coincubation with 293-Necl-2 cells almost completely reduced conjugate formation (lower panel). Percentage of conjugates is indicated. One of three independent experiments is shown.

Table 1 Oligonucleotides used for cloning

Number	Sequence	O	Specificity
1718	GGACGATGACGATAAGGAAAttcgaaccataactgta	S	CRTAM
1719	CTGTGCTGGATATCTGCAatccttctccttcttac	AS	CRTAM
1740	GGACGATGACGATAAGggccagaactgataacag	S	Necl-2
1741	TGGATATCTGCAGAATTcgtccacgctccttattg	AS	Necl-2
1756	AAGCTGGTGCCACGCGaaaccataactgtacagg	S	CRTAM-Ig
1757	GGCATGTGTGAGTTTTGtccttctccttcttactc	AS	CRTAM-Ig

O: orientation indicated as S (sense) and AS (antisense); Capital letters denote regions overlapping with vectors and lower case letters those regions specific for the gene indicated.

Figure 1A

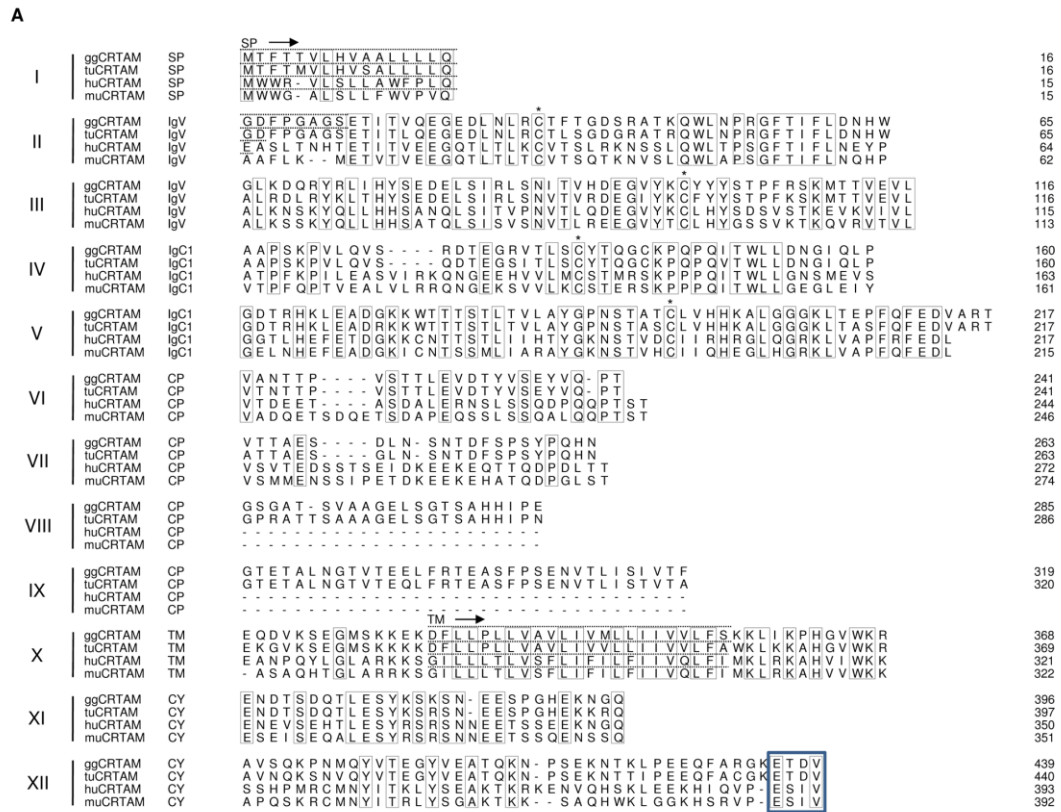


Figure 1B

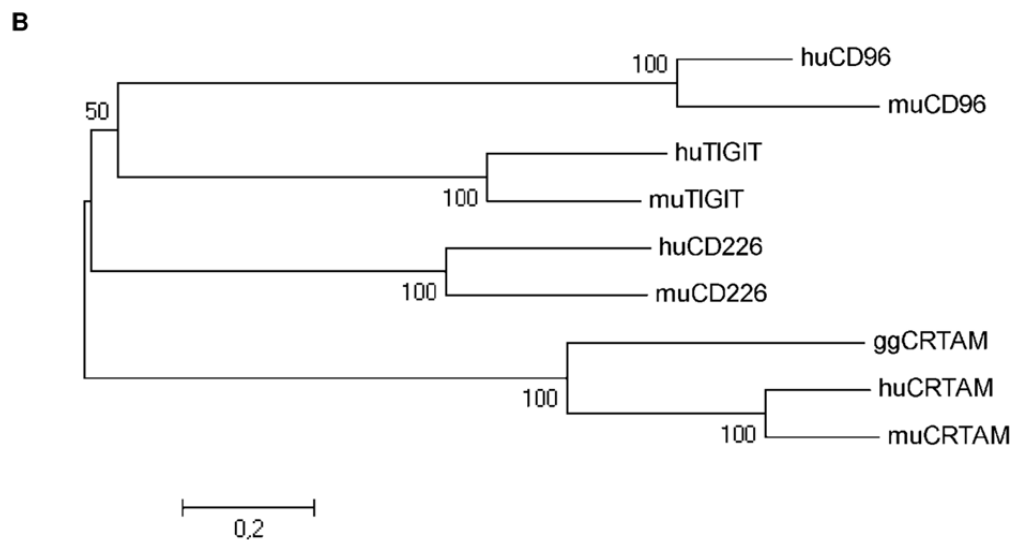


Figure 2A

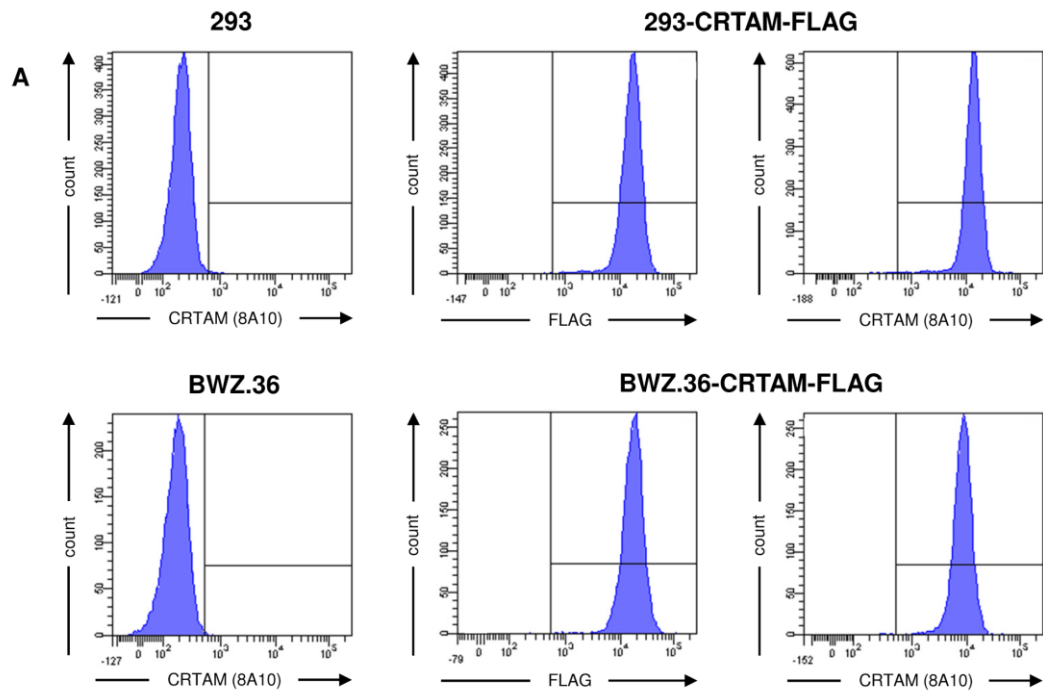


Figure 2B

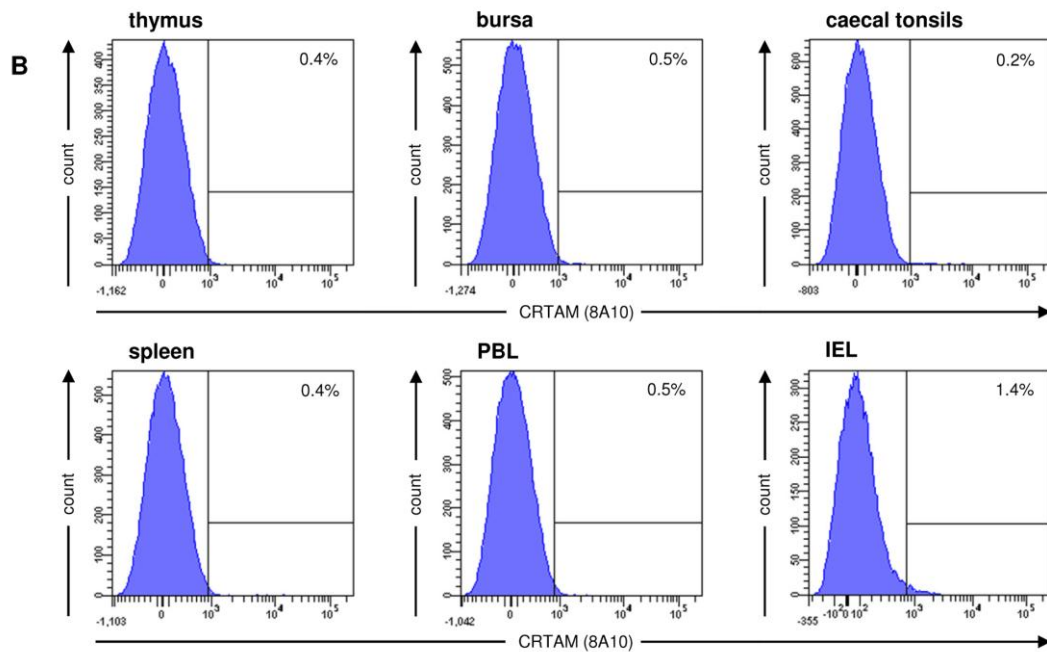


Figure 3A

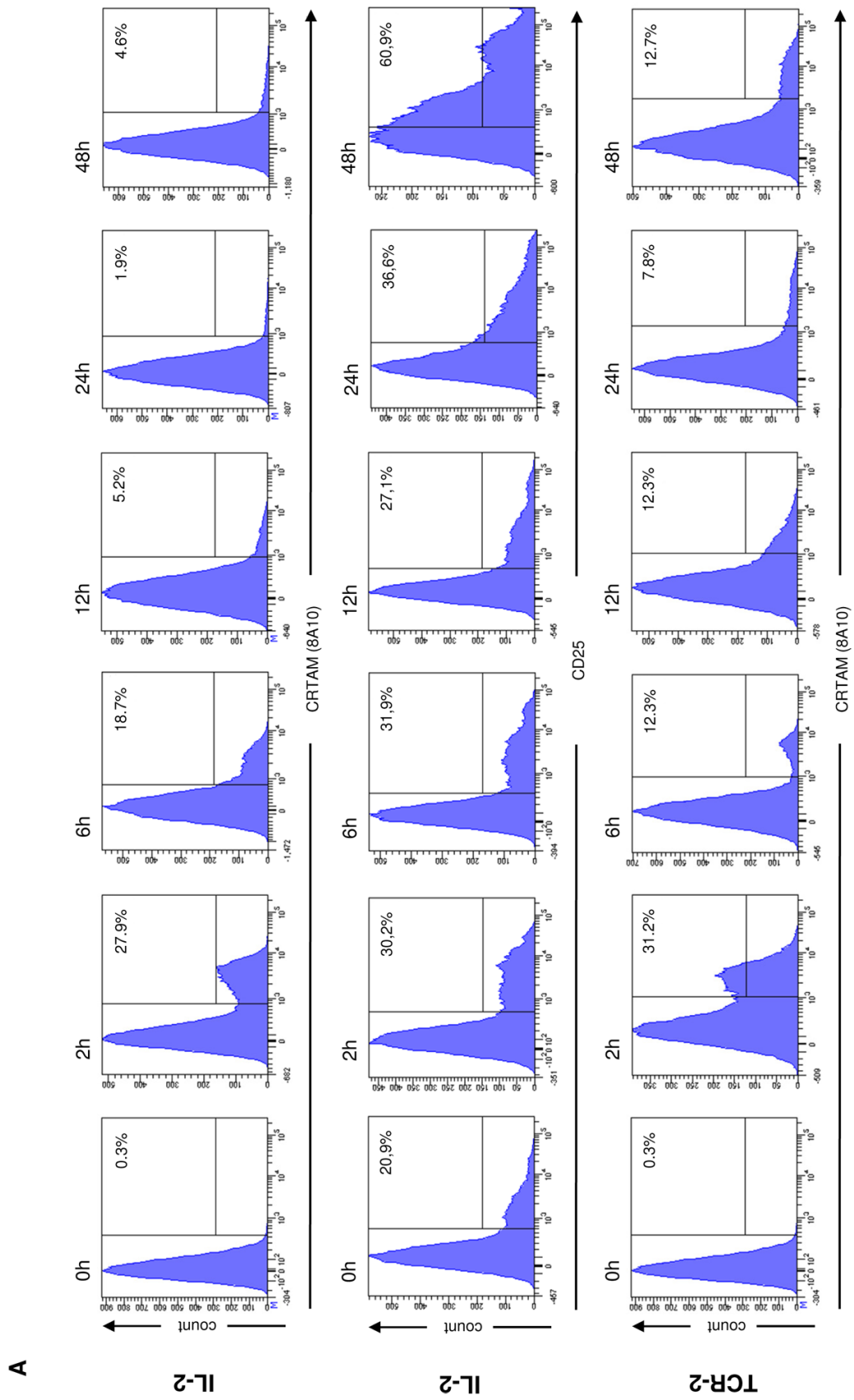


Figure 3B

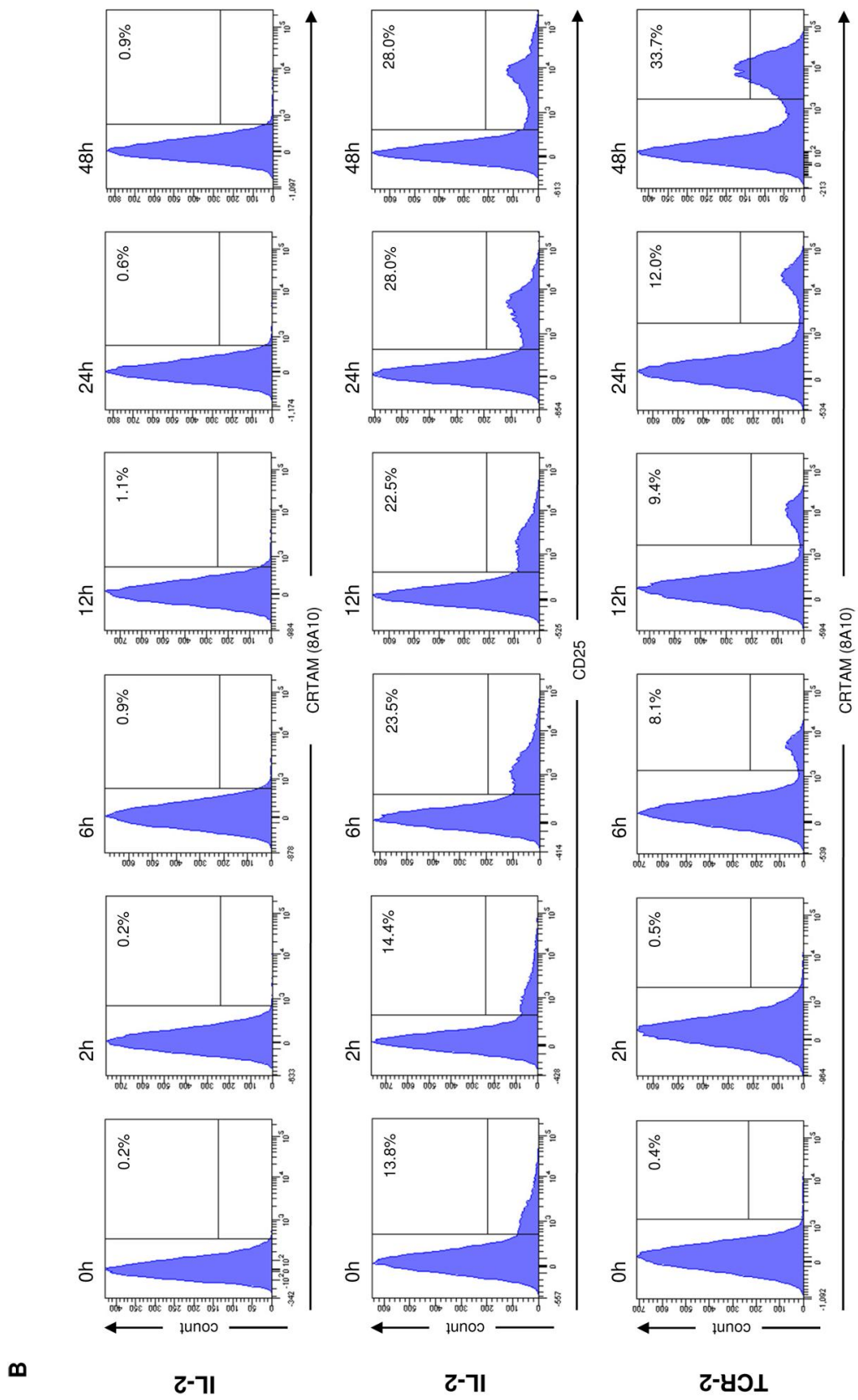


Figure 4

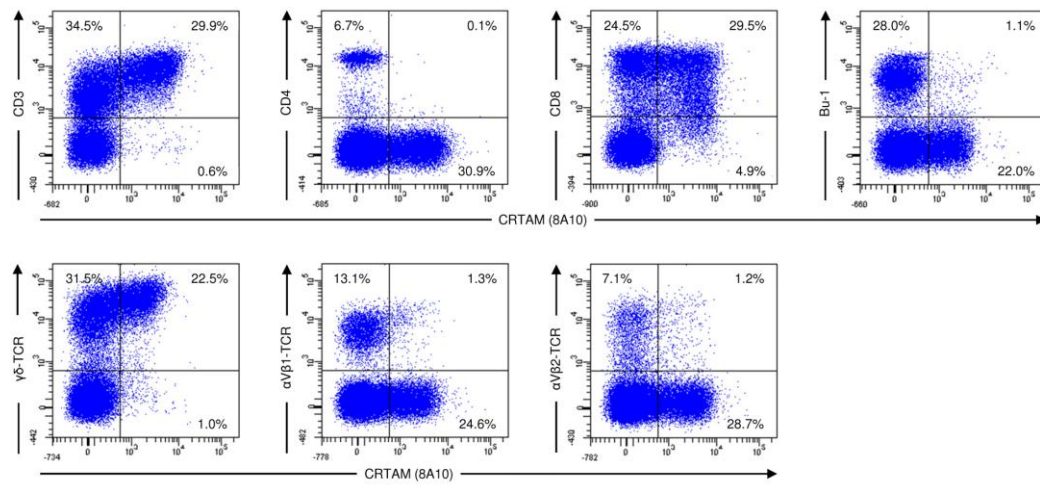


Figure 5

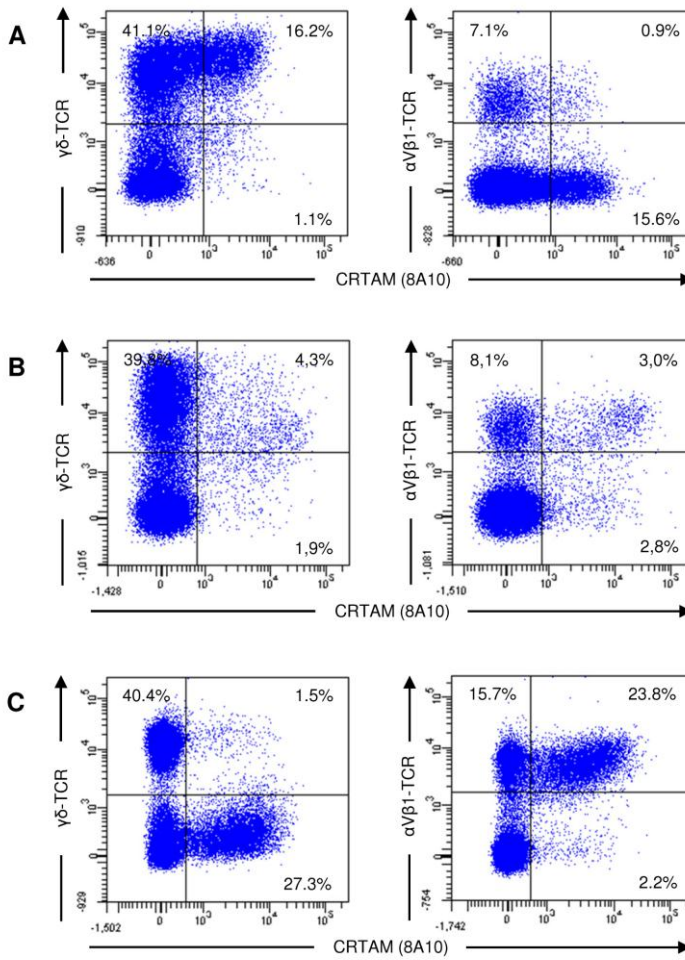


Figure 6

I	ggNecl-2 SP huNecl-2 SP	MDMCFNVE SDGHGHVL QHGVSDGD- - - - - VL HHGHVL QR MASVVL P S G S Q C A A A A A A A P P G L R L R L L L L F S A A L I P T	34 41
II	ggNecl-2 Ig1 huNecl-2 Ig1	- D G Q N L I T E D V T V V E G D V A T I S C R V K N S D D S V I Q L L N P N R Q T I Y F R D F R G D G Q N L F T K D V T V I E G E V A T I S C Q V N K S D D S V I Q L L N P N R Q T I Y F R D F R	82 90
III	ggNecl-2 Ig1 huNecl-2 Ig1	P L K D S R F Q L V N F S N S E L R V S L T N V S I S D E G R Y F C Q L Y T D P P Q E I Y T T I T V L P L K D S R F Q L L N F S S S E L K V S L T N V S I S D E G R Y F C Q L Y T D P P Q E S Y T T I T V L	133 141
IV	ggNecl-2 Ig2 huNecl-2 Ig2	V P P R N L V I D I Q K E I A V E G E E I E L N C T A M A S R P A T T I R W F K G N K E L T V P P R N L M I D I Q K D T A V E G E E I E V N C T A M A S K P A T T I R W F K G N T E L K	179 187
V	ggNecl-2 Ig2 huNecl-2 Ig2	G K S E V E Q W F D M Y T V T S Q L L L K V G R E D D G V P V I C L V D H P A V K - D L Q T Q R Y L E V M G K S E V E E W S D M Y T V T S Q L M L K V H K E D D G V P V I C Q V E H P A V T G N L Q T Q R Y L E V Q	231 240
VI	ggNecl-2 Ig-like huNecl-2 Ig-like	Y K P Q V R V S Q N Y P V Q G L T R E G E P L E L T C A A F G K P Q Y K P Q V H I Q M T Y P L Q G L T R E G D A L E L T C E A I G K P Q	265 274
VII	ggNecl-2 Ig-like huNecl-2 Ig-like	P T D M R W L R V D D E M P Q H V V V S G S N L L I S N L N K T D N G T Y R C E A S N A V G K S H A D Y M L F V Y P V M V T W R V D D E M P Q H A V L S G P N L F I I N N L N K T D N G T Y R C E A S N I V G K A H S D Y M L Y V Y	322 331
VIII	ggNecl-2 CP huNecl-2 CP	D P P T T I P P P T T T T T T T T T T I P T T I T D P P T T I P P P T T T T T T T T T T T T T I L T I I T	346 359
IX	ggNecl-2 CP huNecl-2 CP	D T T A T T E P A V H - - - - -	357
X	ggNecl-2 CP huNecl-2 CP	G F T Q L P N S A E E L D Y G D L S - - - - -	375
XI	ggNecl-2 TM huNecl-2 TM	DSRAGEEGA I R S V D H A V I G G V A V V V F A M L C L L I I L G R Y F A R H K DSRAGEEGS I R A V D H A V I G G V A V V V F A M L C L L I I L G R Y F A R H K	419 403
XII	ggNecl-2 CY huNecl-2 CY	G T Y F T H E A K G A D D A A D A D T A I I N A E G G Q N N S E E K K E Y F I G T Y F T H E A K G A D D A A D A D T A I I N A E G G Q N N S E E K K E Y F I	458 442

Figure 7A

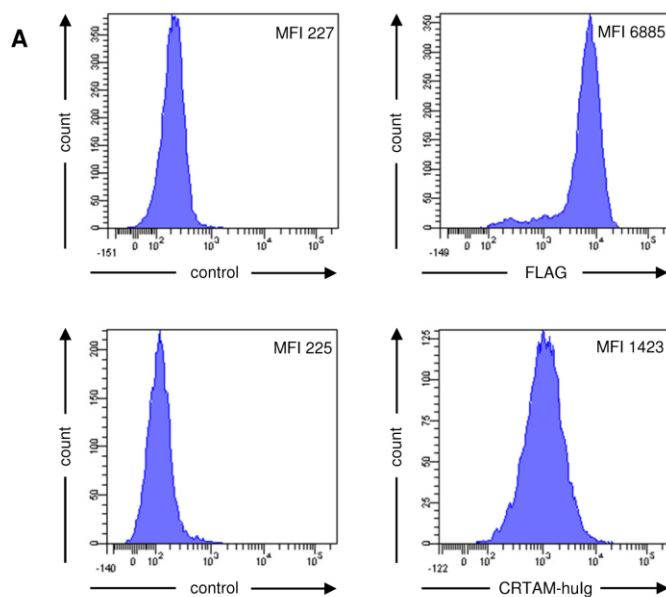
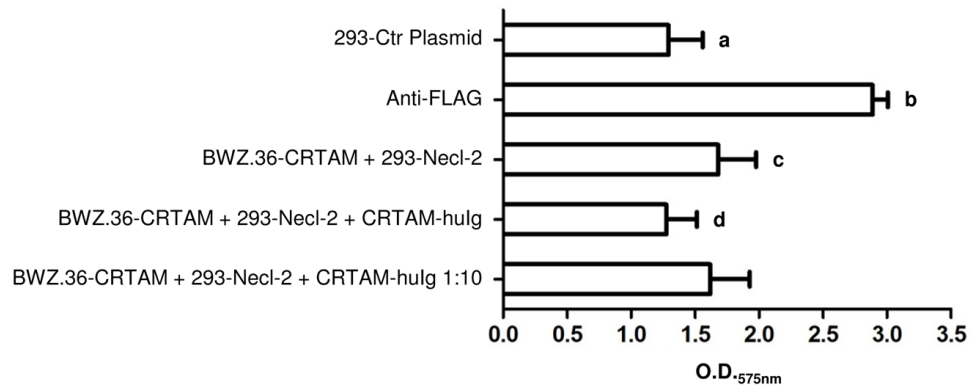
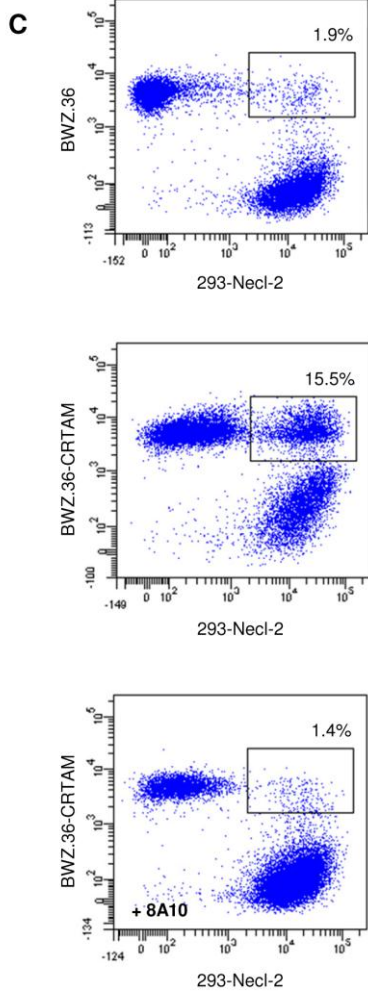


Figure 7B**B****Figure 7C**

Supplementary Figure 1

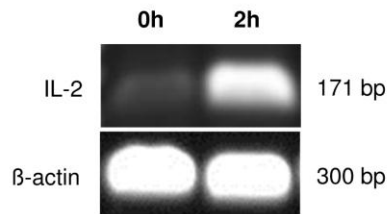


Figure S1. Detection of a splenic IL-2 transcript after 2 h of TCR-2 stimulation

Splenocytes were stimulated with immobilized anti-TCR-2 mab for 2h. The expression of IL-2 and β -actin was analyzed by PCR.

Supplementary Text 1

Supplementary Materials and Methods

Cell preparation

For PCR analysis freshly isolated splenocytes were prepared by passing the organ through a stainless steel mesh. Lymphocytes were obtained from the cell suspension by density centrifugation on Ficoll-Hypaque (Biochrom, Berlin, Germany).

mRNA preparation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from unstimulated splenocytes or splenocytes stimulated with TCR-2 mab for 2 hours using the Trizol method (Peqlab, Erlangen, Germany). For removal of genomic DNA, the Rapid Out DNA Removal Kit was applied (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Finally, cDNA was amplified using the ThermoScriptTM RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen, Karlsruhe, Germany).

PCR analysis

A PCR was performed using the GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). The primers utilized for amplification were as follows:

β -actin, sense primer (5'- TACCACAATGTACCCTGGC-3') and anti-sense primer (5'- CTCGTCTTGTTTTATGCGC-3');

IL-2, sense primer (5'- ACCAACTGAGACCCAGGAGT-3') and anti-sense primer (5'- CCGGTGTGATTTAGACCCGT-3').

5. DISKUSSION

Die kritische Rolle der Kostimulation bei der Regulation des Immunsystems hat vor allem in den letzten Jahren den Antrieb dazu gegeben, kostimulatorische Signalwege zur Feinabstimmung von T-Zell-Antworten zu erforschen. Dabei ist man auf das TIGIT/CD226 Netzwerk gestoßen, welches analog dem gut charakterisierten CD28/CTLA4-Weg zur T-Zell-Aktivierung oder zur Anergie der T-Zellen beizutragen scheint und dem eine wichtige Rolle bei der Regulation von humanen Autoimmunerkrankungen zugesprochen wird [6]. Diese beiden Moleküle gehören zu einer Gruppe von Proteinen, deren Gemeinsamkeit unter anderem darin besteht, dass sie an Familienmitglieder der Nectine und Necls binden [7, 8]. Obwohl TIGIT im Hühnergenom noch nicht aufgefunden wurde, könnte durch das Vorhandensein der anderen Mitglieder dieser wichtigen Gruppe von Rezeptoren, nämlich CRTAM und CD226, das System zur Regulation von T-Zell-Antworten auch im Huhn konserviert sein.

Während das Hühner cTADS im Jahr 2000 als ein neues Mitglied der Ig-Superfamilie mit Ähnlichkeiten zu verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen beschrieben wurde [94], identifizierte man etwa zur selben Zeit beim Säuger das CRTAM Gen. Daher war die Herstellung einer Verbindung dieser beiden Moleküle durch die annähernd gleichzeitige Veröffentlichung erschwert [87]. Jedoch fallen schon beim Vergleich der Aminosäuresequenzen ähnliche Strukturmerkmale dieser beiden Proteine auf. 2004 arbeitete dann eine Studie die Beziehung vom Säuger CRTAM und dem Hühner cTADS heraus [95]. Diese Studie zielte darauf ab, eine Verbindung zwischen dem angeborenen Immunsystems des Urchordate *Ciona intestinalis* und den Rezeptoren des adaptiven Immunsystems der Ig-Superfamilie herzustellen. Interessanterweise scheint CRTAM neben den weit entfernten Homologen in Nicht-Säuger Vertebraten auch Homologe in *Drosophila* zu haben. Dort teilt die BEAT Familie, eine Multigenfamilie, welche Proteine der Ig-Superfamilie kodiert, ähnliche strukturelle Merkmale, so z.B. eine identische Organisation der Domänen [95]. In *Ciona intestinalis* begründet ein Gencluster, welches auf den Chromosomen 4 und 10 repräsentiert ist, vier paraloge Regionen durch zwei komplette Genomduplikationen [96]. Vergleichende Studien haben gezeigt, dass im Hühnergenom die Chromosomen 1, 4, 24 und 31 diese paraloge Regionen darstellen und tatsächlich sind mehrere wichtige Gruppen der Ig-Superfamilie auf

diesen Chromosomen lokalisiert, wie die CD200 Familie auf Chromosom 1, das Hühner Leukozytenrezeptorcluster auf Chromosom 31, sowie CRTAM und Necl-2 auf Chromosom 24 [97-99].

Bereits 2010 erwähnte die Arbeitsgruppe um Garay die Sequenzähnlichkeit von CRTAM und Necl-2, vor allem bezüglich der ersten Ig-ähnlichen Domäne. Außerdem arbeitete sie heraus, dass CRTAM eher den Necls als den *junctional cell adhesion molecules* (JAMs) gleicht [92]. Auch teilt CRTAM mit den Necls charakteristische Züge bezüglich der Proteinsequenz und ist phylogenetisch näher verwandt zu ihnen [100]. Im Hühner CRTAM und Necl-2 finden sich die gleichen charakteristischen Aminosäurenstrukturen wie beim Säuger, bei welchem sie für homo- und heterotypische Bindungen verantwortlich sind (Abbildung 4). Es wäre also durchaus denkbar, dass beim Huhn dieselben Aminosäuren wie beim Säuger an der Ligandenbindung beteiligt sind, was jedoch zukünftig noch durch gezielte Punktmutationsstudien verifiziert werden muss.

ggCRTAM	- - - - - ETI TVQEGEDLNLRC [*] FTTGDSRATKQWLNPRGFTI FLDNHW	41
huCRTAM	SLTNHTETI TVEEGQTLTLKCVTSLRKNSLQWLTSPSGFTI FLNEYF	47
ggNecl-2	- QNLI TEDVTVVEGDVATI SCRVKNSDDSVI QLLNPNRQTI YFRDFR	46
huNecl-2	- QNLF TKDVTVI EGEVATI SCQVKNSSDDSVI QLLNPNRQTI YFRDFR	46
ggCRTAM	GLKDQRYRLI HYSEDELSI RLSNI TVHDEGVYK [*] CYYYSTPFRSKMTTVEVL	92
huCRTAM	ALKNSKYQLLHHSANQLSI TVPNVTLQDEGVYKCLHYSDSVSTKEVKVI VL	98
ggNecl-2	PLKDSRFQLVNFNSSELRVSLTNVSI SDEGRYFCQLYTDPPQEI YTTI TVL	97
huNecl-2	PLKDSRFQLLNFSSSELKVSLTNVSI SDEGRYFCQLYTDPPQESYTTI TVL	97

Abbildung 4: Sequenz-Alignment der ersten Ig-ähnlichen Domäne von Hühner (gg) und humanem (hu) CRTAM sowie Necl-2. Die charakteristischen Rezeptor-Liganden-Bindungsstellen, welche die hauptsächlichen Kontakte in der Homo- und Heterodimerbildung repräsentieren, sind blau eingezeichnet. Dabei stellen F39 und Y84 bei huCRTAM und Y83 und P47/L48 bei huNecl-2 sehr wichtige Bindungsstellen dar. Beim Huhn sind diese wichtigen Aminosäuren ebenfalls vorhanden, was dafür sprechen könnte, dass beim Huhn dieselben Aminosäurenstrukturen wie beim Menschen für die Ligandenbindung verantwortlich sein könnten. Abbildung modifiziert nach Zhang *et al.* [100]

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine neue Methode verwendet, um die enge Verbindung von CRTAM und der Nectin-Familie zu demonstrieren. Man kam zu dem Ergebnis, dass beide Rezeptoren zu der Nectin-like Familie gehören [101]. Die Erkenntnis, dass beide Gene zusätzliche Exons in Hühnervögeln teilen, unterstützt dieses Resultat. Ein herausragendes Merkmal von Necl-2 und CRTAM ist nämlich eine Besonderheit in ihrer genomischen Organisation im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Ig-Superfamilie. Beide enthalten zwei zusätzliche Exons,

welche für Reste kodieren, die sich zwischen den membranproximalen und den transmembranen Domänen befinden. Jedoch bleibt zu klären, warum diese Region in den Säugermolekülen nicht vorhanden ist und was die funktionelle Relevanz einer erweiterten membranproximalen Region darstellt.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von CRTAM und anderen Nectinen ist ihre Expression auf Leukozyten, auf Zellen des Nervensystems, wie z.B. Purkinje Zellen im Kleinhirn [93] und auf Epithelzellen [92]. Die Analyse der CRTAM Expression im Gehirn geht über die Zielsetzung dieser Arbeit hinaus, wird aber in zukünftigen Studien untersucht. Zusammenfassend ist zu sagen, dass CRTAM ein gut konserviertes Molekül darstellt, welches verschiedene Funktionen im Immunsystem und Nervensystem erfüllt.

Um einen näheren Einblick in die Gewebeexpression von CRTAM im Allgemeinen und die Expression auf Leukozyten im Besonderen zu erhalten, wurde ein monoklonaler Antikörper generiert. Dabei konnte auf frisch isolierten Zellen von mehreren Geweben keine CRTAM Oberflächenexpression nachgewiesen werden, was gut mit den Säugerdaten der CRTAM Expression korreliert. Daraufhin wurden mehrere Aktivierungsmethoden sowohl an Milz- als auch Blutzellen getestet. Ein faszinierender Aspekt dabei war die unterschiedliche und transiente Expression von CRTAM auf aktivierten Zellen. Während das Molekül in der Milz bereits zwei Stunden nach Stimulation mit TCR-2 und IL-2 exprimiert wird, zeigt sich die Expression im Blut erst nach 24 bis 48 Stunden und nur bei Stimulation mit TCR-2.

Die rasche CRTAM Hochregulation auf Milzzellen zwei Stunden nach IL-2 oder TCR-2 Stimulation stimmt mit Daten überein, die über die mRNA-Expression von cTADS veröffentlicht wurden [94]. Da CRTAM mRNA sehr früh nach zellulärer Aktivierung nachweisbar ist, spricht das eher für eine *de novo* Proteinbiosynthese von CRTAM als für eine Oberflächenexpression von präformierten, intrazellulär gelagerten Rezeptorproteinen, wie es z.B. für Moleküle wie CD300a bekannt ist [102].

Diese frühe Hochregulation auf Milzzellen durch IL-2 war hauptsächlich auf $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisbar. Bei Blutzellen ergab sich hingegen ein ganz anderes Expressionsmuster. Nach IL-2 Stimulation von PBL konnte CRTAM nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden, obwohl durch Detektion der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) aufgezeigt werden konnte, dass die Stimulation von PBL durch IL-2 im Allgemeinen funktioniert hat.

Im Gegensatz dazu wurde nach TCR-2 Kreuzvernetzung CRTAM auf PBL exprimiert, aber zu späteren Zeitpunkten mit einem Maximum nach 48 Stunden Stimulation und hauptsächlich auf $\alpha\text{V}\beta 1$ T-Zellen. Somit ergeben sich für Milz- und Blutzellen zwei völlig verschiedene Expressionsmuster von CRTAM. Milz und Blut $\gamma\delta$ T-Zellen unterscheiden sich auch in ihrer Expression von anderen Molekülen, so fehlen z.B. Blut $\gamma\delta$ T-Zellen die CD6 Expression und sie zeigen nur geringe Level von CD5 auf der Oberfläche [103-105]. Während Blut $\gamma\delta$ T-Zellen also widerstandsfähig gegen Aktivierung zu sein scheinen, kann eine Untergruppe von Milz $\gamma\delta$ T-Zellen ohne Umstände aktiviert werden.

Wegen der frühen Expression auf vor allem CD8 positiven $\gamma\delta$ T-Zellen stellt CRTAM einen frühen und transienten Aktivierungsmarker für die zytotoxische T-Zellantwort dar. Das transiente Erscheinen von CRTAM auf der Zelloberfläche könnte eine Vermeidungsstrategie darstellen, da so hauptsächlich spezifische Interaktionen zwischen CRTAM und Necl-2 forciert werden und nichtspezifische unnötige Adhäsionen und somit ungerichtete Immunreaktionen minimiert werden [9].

Aufgrund der hohen Expression von CRTAM auf $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz wurde auch die intestinale intraepitheliale Lymphozytenpopulation (IEL), eine andere reiche Quelle von $\gamma\delta$ T-Zellen beim Huhn, auf CRTAM-Expression untersucht. Dabei war es weder möglich, CRTAM auf unaktivierten noch auf aktivierten IEL nachzuweisen. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass IEL wiederum eine andere Untergruppe von $\gamma\delta$ T-Zellen beherbergt. Es wurde schon beschrieben, dass sich diese Population auch in der Expression eines weiteren Moleküls von anderen $\gamma\delta$ T-Zellen unterscheidet, sie exprimieren nämlich CD8 $\alpha\alpha$ Homodimere anstelle von CD8 $\alpha\beta$ Heterodimeren [106].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die frühe Hochregulierung von CRTAM auf $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz nach Stimulation der $\alpha\beta$ T-Zellen durch TCR-2 Kreuzvernetzung. Der TCR-2 Antikörper erkennt spezifisch $\alpha\text{V}\beta 1$ T-Zellen, daher kann eine direkte Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen durch diesen Antikörper ausgeschlossen werden [107, 108]. Eine mögliche Begründung dafür konnte sein, dass die IL-2 Sekretion von den durch TCR-2 aktivierten $\alpha\text{V}\beta 1$ T-Zellen in den Prozess der Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen beteiligt ist, da schon IL-2 für sich CRTAM Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen induziert. Bereits in früheren Berichten wurde gezeigt, dass $\gamma\delta$ T-Zellen im Huhn entweder $\alpha\beta$ T-Zellen oder exogene Zytokine als Wachstumsfaktoren benötigen [109]. Zur vollständigen Abklärung

dieser Hypothese wäre es jedoch nötig, IL-2 durch einen spezifischen Assay nachzuweisen. Da solch ein sensitives Nachweissystem beim Huhn leider noch nicht verfügbar ist, wurde eine IL-2 spezifische PCR mit unstimulierten und zwei Stunden TCR-2 stimulierten Milzlymphozyten durchgeführt. Dabei konnte in diesem Experiment eine eindeutige Hochregulierung von IL-2 mRNA nach TCR-2 Stimulation nachgewiesen werden.

Es war außerdem möglich, Necl-2 in drei voneinander unabhängigen Assays eindeutig als Ligand für CRTAM zu bestätigen und diese Ergebnisse durch eine detaillierte statistische Auswertung zu untermauern. Im Säuger ist Necl-2 auf der basolateralen Membran von Epithelzellen und auf verschiedenen Tumorzellen exprimiert [8, 92]. Die Interaktion von CRTAM und Necl-2 führt zur IFN- γ Sekretion und T-Zell-Stimulation, als auch zur Sekretion von IL-22 [10, 11]. Ein wichtiger Schritt zur Abklärung, ob ähnliche Reaktionen im Huhn vorhanden sind, wäre die Etablierung eines Nachweisverfahrens für IFN- γ . Erste Versuche der Stimulation von CRTAM positiven Zellen zur IFN- γ Sekretion und der Nachweis dieses Zytokins blieben bis jetzt jedoch erfolglos.

Ein wichtiger Unterschied zum Säuger CRTAM besteht darin, dass beim Huhn keine CRTAM-Expression auf NK-Zellen nachgewiesen werden konnte.

Im adulten Huhn sind die NK-Zell-Frequenzen entweder sehr niedrig, z.B. im Blut, oder nicht nachweisbar, z.B. in der Milz. Jedoch beherbergten IEL eine höhere Frequenz von NK-Zellen. Weder auf vom Blut stammenden, noch auf von Dünndarm isolierten NK-Zellen konnte vor und nach Stimulation eine CRTAM Expression nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte aus der Tatsache entstehen, dass die Lymphozyten-Subpopulationen vom Huhn im Vergleich zu denen von Mensch und Maus anders zusammengesetzt sind. Hühner besitzen eine viel höhere Rate von $\gamma\delta$ T-Zellen (bis zu 50 % der Milz und Blut Lymphozyten [110]), jedoch viel geringere Frequenzen an NK-Zellen. Dieses könnte darauf hindeuten, dass $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen ähnliche Funktionen haben und um die gleiche immunologische Nische konkurrieren [111].

Im Gegensatz zu den Daten von Ruble und Forster, welche unter anderem die embryonale CRTAM-Expression auf mRNA-Ebene untersucht haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine CRTAM-Oberflächenexpression auf embryonalen Thymuszellen festgestellt werden [94]. Somit konnte auch die These nicht bestätigt werden, dass CRTAM für die embryonale T-Zell-Proliferation wichtig sein könnte.

Durch die Charakterisierung des Oberflächenrezeptors CRTAM im Huhn war es möglich, einen frühen Aktivierungsmarker für die spezifische T-Zell-Antwort im Huhn zu generieren und somit tiefere Einblicke in die adaptive Immunantwort beim Huhn zu erhalten. Auch ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, Necl-2 als Bindungspartner für CRTAM im Huhn zu identifizieren. Zudem konnte ein erster Schritt gemacht werden, um nähere Einblicke in immunmodulatorische Vorgänge beim Huhn zu erlangen. Um dieses Ziel weiter zu verfolgen und ein eventuelles Zusammenspiel von CRTAM mit anderen Rezeptoren seiner Familie zu klären, werden zukünftig weitere Vertreter dieser Gruppe, wie zur Zeit der Rezeptor CD226, charakterisiert.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Charakterisierung von Hühner CRTAM

Das cTADS Molekül wurde ursprünglich bereits 2000 als ein neues Mitglied der Ig-Superfamilie identifiziert, welches möglicherweise in T-Zell-Aktivierung und -Entwicklung involviert ist. Durch seine Sequenzähnlichkeiten und typischen konservierten Sequenzstrukturen konnte dieses Molekül als CRTAM-Homolog identifiziert werden.

Um das Expressionsmuster dieses Moleküls aufzuzeigen und insbesondere um herauszustellen, ob CRTAM einen möglichen immunmodulatorisch wirkenden Oberflächenrezeptor im Huhn darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein spezifischer monoklonaler Antikörper generiert.

Während auf unaktivierten Zellen verschiedener Hühnergewebe und Blutzellen keine CRTAM-Expression nachgewiesen werden konnte, war dieses Molekül transient auf CD8 positiven T-Zellen von Blut, Thymus, Milz und Caecaltonsillen nach Aktivierung mit rekombinanten IL-2, Concanavalin A, TCR-Kreuzvernetzung und Phorbol Myristate Acetat-Calcium-Ionophor nachweisbar.

Die Aktivierung von Milzzellen mit rekombinanten IL-2 führte zu einer raschen und transienten CRTAM-Expression innerhalb zwei Stunden auf CD8 positiven $\gamma\delta$ T-Lymphozyten, wohingegen auf PBL keine CRTAM Expression stimuliert werden konnte. Im Gegensatz dazu führte die TCR Kreuzvernetzung mit einem anti- $\alpha V\beta 1$ TCR Antikörper zu einer CRTAM-Expression auf sowohl PBL, als auch auf Milzzellen, aber mit einer unterschiedlichen Kinetik und auf verschiedenen T-Zell-Subpopulationen. Während die TCR-2 Stimulation von PBL zu einer CRTAM-Expression auf $\alpha\beta$ T-Zellen mit einem Maximum zwischen 24 und 48 Stunden Stimulation führte, zeigte die CRTAM Expression auf Milzzellen zwei Stunden nach Stimulation ihr Maximum. Dabei war sie nach zwei Stunden beschränkt auf CD8 positive $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und erst nach 24 bis 48 Stunden auch auf $\alpha\beta$ T-Zellen nachweisbar.

Um den potentiellen Liganden zu charakterisieren, wurden drei voneinander unabhängige Assays generiert und somit konnte Necl-2, ein Mitglied der Nectin und Necl-Familie von Zelladhäsionsmolekülen, als ein Ligand für Hühner CRTAM identifiziert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CRTAM nur auf aktivierten CD8 positiven T-Lymphozyten exprimiert wird und Necl-2 den Bindungspartner für

das Hühner CRTAM darstellt.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das Hühner CRTAM einen Oberflächenmarker auf aktivierten CD8 positiven T-Zellen im Huhn darstellt und dass die Interaktion zwischen CRTAM und Necl-2 eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und der Interaktion von aktivierten zytotoxischen T-Zellen spielen könnte.

7. SUMMARY

Characterization of chicken CRTAM

The cTADS molecule was originally described as a new member of the immunoglobulin superfamily potentially involved in T cell activation and development. Due to sequence identity and typical conserved sequence features, this molecule could be identified as a CRTAM homologue.

In order to delineate the expression pattern of this molecule and in particular its potential as an immunomodulatory cell surface receptor, a monoclonal antibody was generated.

Staining of various chicken tissues and blood cells revealed no reactivity. In contrast, CRTAM surface expression was transiently detectable on CD8 positive T cells isolated from blood, thymus, spleen and caecal tonsils following activation with recombinant IL-2 as well as with Concanvalin A, TCR crosslinking with anti-TCR2 and phorbol myristate acetate-calcium-ionophore treatment.

Activation of splenocytes with recombinant IL-2 led to a rapid and transient CRTAM expression within 2 hours on CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes, whereas on PBL no CRTAM expression was detectable. In contrast, TCR crosslinking using an anti- $\alpha V\beta 1$ TCR induced CRTAM expression on both PBL and splenocytes but with different kinetics and on different subpopulations. The anti-TCR-2 stimulation of PBL resulted in a CRTAM expression on $\alpha\beta$ T cells with an optimum in between 24 to 48 hours of stimulation. However, the CRTAM expression on splenocytes after 2 hours of stimulation was restricted to CD8⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes and only detectable on $\alpha\beta$ T cells 24-48 h after stimulation.

In order to characterize the potential ligand, three independent assays were generated and as a result chicken Necl-2, a family member of the Nectin and Nectin-like cell adhesion molecules, could be identified as a ligand of chicken CRTAM.

In summary, chicken CRTAM is only expressed on activated cytotoxic lymphocytes and the Nectin-like protein 2 functions as a binding partner to chicken CRTAM.

These results demonstrate that chicken CRTAM represents a surface marker for activated CD8 positive T cells in chicken and that the CRTAM- Necl-2 interaction could play an important role in cell adhesion and cytotoxic T cell function.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Burshtyn, D.N., et al., *A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13066-72.
2. Vivier, E., J.A. Nunes, and F. Vely, *Natural killer cell signaling pathways*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1517-9.
3. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
4. Humphrey, M.B., L.L. Lanier, and M.C. Nakamura, *Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone*. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 50-65.
5. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 12-26.
6. Lozano, E., et al., *The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3869-75.
7. Chan, C.J., D.M. Andrews, and M.J. Smyth, *Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 246-51.
8. Fuchs, A. and M. Colonna, *The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(5): p. 359-66.
9. Arase, N., et al., *Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells*. Int Immunol, 2005. **17**(9): p. 1227-37.
10. Boles, K.S., et al., *The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM*. Blood, 2005. **106**(3): p. 779-86.
11. Galibert, L., et al., *Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule*. J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 21955-64.
12. Takai, Y., et al., *The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008. **24**: p. 309-42.
13. Takai, Y., et al., *Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization*. Cancer Sci, 2003. **94**(8): p. 655-67.

14. Takai, Y. and H. Nakanishi, *Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 1): p. 17-27.
15. Geraghty, R.J., et al., *Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1618-20.
16. Warner, M.S., et al., *A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus*. Virology, 1998. **246**(1): p. 179-89.
17. Mandai, K., et al., *Afadin: A novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction*. J Cell Biol, 1997. **139**(2): p. 517-28.
18. Takahashi, K., et al., *Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein*. J Cell Biol, 1999. **145**(3): p. 539-49.
19. Reymond, N., et al., *Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction*. J Biol Chem, 2001. **276**(46): p. 43205-15.
20. Lopez, M., et al., *Novel, soluble isoform of the herpes simplex virus (HSV) receptor nectin1 (or PRR1-HlgR-HveC) modulates positively and negatively susceptibility to HSV infection*. J Virol, 2001. **75**(12): p. 5684-91.
21. Takekuni, K., et al., *Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse*. J Biol Chem, 2003. **278**(8): p. 5497-500.
22. Reymond, N., et al., *PICK-1: a scaffold protein that interacts with Nectins and JAMs at cell junctions*. FEBS Lett, 2005. **579**(10): p. 2243-9.
23. Adachi, M., et al., *Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight-junction proteins*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(9): p. 2372-89.
24. Dudak, A., et al., *Membrane palmitoylated proteins regulate trafficking and processing of nectins*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(5): p. 365-75.
25. Gregory Call, S., et al., *A zyxin-nectin interaction facilitates zyxin localization to cell-cell adhesions*. Biochem Biophys Res Commun, 2011.

- 415**(3): p. 485-9.
26. Ishiuchi, T. and M. Takeichi, *Nectins localize Willin to cell-cell junctions*. Genes Cells, 2012. **17**(5): p. 387-97.
 27. Takai, Y., et al., *Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(8): p. 603-15.
 28. Fukuhara, H., et al., *Association of a lung tumor suppressor TSLC1 with MPP3, a human homologue of Drosophila tumor suppressor Dlg*. Oncogene, 2003. **22**(40): p. 6160-5.
 29. Shingai, T., et al., *Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35421-7.
 30. Kakunaga, S., et al., *Nectin-like molecule-1/TSLC1/SynCAM3: a neural tissue-specific immunoglobulin-like cell-cell adhesion molecule localizing at non-junctional contact sites of presynaptic nerve terminals, axons and glia cell processes*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 6): p. 1267-77.
 31. Yageta, M., et al., *Direct association of TSLC1 and DAL-1, two distinct tumor suppressor proteins in lung cancer*. Cancer Res, 2002. **62**(18): p. 5129-33.
 32. Mueller, S., et al., *Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7897-904.
 33. Sato, T., et al., *Involvement of heterophilic trans-interaction of Necl-5/Tage4/PVR/CD155 with nectin-3 in formation of nectin- and cadherin-based adherens junctions*. Genes Cells, 2004. **9**(9): p. 791-9.
 34. Inagaki, M., et al., *Role of cell adhesion molecule nectin-3 in spermatid development*. Genes Cells, 2006. **11**(9): p. 1125-32.
 35. Mueller, S., et al., *Loss of nectin-2 at Sertoli-spermatid junctions leads to male infertility and correlates with severe spermatozoan head and midpiece malformation, impaired binding to the zona pellucida, and oocyte penetration*. Biol Reprod, 2003. **69**(4): p. 1330-40.
 36. Ozaki-Kuroda, K., et al., *Nectin couples cell-cell adhesion and the actin scaffold at heterotypic testicular junctions*. Curr Biol, 2002. **12**(13): p. 1145-50.

37. Honda, T., et al., *Involvement of nectins in the formation of puncta adherentia junctions and the mossy fiber trajectory in the mouse hippocampus*. Mol Cell Neurosci, 2006. **31**(2): p. 315-25.
38. Inagaki, M., et al., *Roles of cell-adhesion molecules nectin 1 and nectin 3 in ciliary body development*. Development, 2005. **132**(7): p. 1525-37.
39. Fujito, T., et al., *Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3*. J Cell Biol, 2005. **171**(1): p. 165-73.
40. Kakunaga, S., et al., *Enhancement of serum- and platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by Necl-5/Tage4/poliovirus receptor/CD155 through the Ras-Raf-MEK-ERK signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36419-25.
41. Wakamatsu, K., et al., *Up-regulation of loricrin expression by cell adhesion molecule nectin-1 through Rap1-ERK signaling in keratinocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18173-81.
42. Ikeda, W., et al., *Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis*. J Cell Biol, 1999. **146**(5): p. 1117-32.
43. Komura, H., et al., *Establishment of cell polarity by afadin during the formation of embryoid bodies*. Genes Cells, 2008. **13**(1): p. 79-90.
44. Fukuhara, A., et al., *Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions*. Oncogene, 2002. **21**(50): p. 7642-55.
45. Fukuhara, A., et al., *Role of nectin in organization of tight junctions in epithelial cells*. Genes Cells, 2002. **7**(10): p. 1059-72.
46. Kanzaki, N., et al., *Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 12): p. 2008-17.
47. Maurel, P., et al., *Nectin-like proteins mediate axon Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination*. J Cell Biol, 2007. **178**(5): p. 861-74.
48. Spiegel, I., et al., *A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination*. Nat Neurosci, 2007. **10**(7): p. 861-9.
49. Muhlebach, M.D., et al., *Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 530-3.
50. Mendelsohn, C.L., E. Wimmer, and V.R. Racaniello, *Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a*

- new member of the immunoglobulin superfamily*. Cell, 1989. **56**(5): p. 855-65.
51. Masuda, M., et al., *CADMI interacts with Tiam1 and promotes invasive phenotype of human T-cell leukemia virus type I-transformed cells and adult T-cell leukemia cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 15511-22.
 52. Takahashi, Y., et al., *Aberrant expression of tumor suppressors CADMI and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer*. Breast Cancer, 2012. **19**(3): p. 242-52.
 53. Narita, H., et al., *Crystal Structure of the cis-Dimer of Nectin-1: implications for the architecture of cell-cell junctions*. J Biol Chem, 2011. **286**(14): p. 12659-69.
 54. Satoh-Horikawa, K., et al., *Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10291-9.
 55. Fuchs, A., et al., *Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155)*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 3994-8.
 56. Bottino, C., et al., *Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 557-67.
 57. Stanietsky, N., et al., *The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17858-63.
 58. Rikitake, Y., K. Mandai, and Y. Takai, *The role of nectins in different types of cell-cell adhesion*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 16): p. 3713-22.
 59. Wang, P.L., et al., *Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2600-8.
 60. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
 61. Hosen, N., et al., *CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(26): p. 11008-13.
 62. Kaname, T., et al., *Mutations in CD96, a member of the immunoglobulin superfamily, cause a form of the C (Opitz trigonocephaly) syndrome*. Am J

- Hum Genet, 2007. **81**(4): p. 835-41.
63. Eriksson, E.M., et al., *Differential expression of CD96 surface molecule represents CD8(+) T cells with dissimilar effector function during HIV-1 infection*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51696.
64. Seth, S., et al., *The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **364**(4): p. 959-65.
65. Shibuya, A., L.L. Lanier, and J.H. Phillips, *Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1671-6.
66. Burns, G.F., et al., *TLISA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors*. J Exp Med, 1985. **161**(5): p. 1063-78.
67. Scott, J.L., et al., *Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation*. J Biol Chem, 1989. **264**(23): p. 13475-82.
68. Tahara-Hanaoka, S., et al., *Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(3): p. 996-1000.
69. Tahara-Hanaoka, S., et al., *Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112)*. Int Immunol, 2004. **16**(4): p. 533-8.
70. Verhoeven, D.H., et al., *NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways*. Mol Immunol, 2008. **45**(15): p. 3917-25.
71. Shibuya, K., et al., *Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule*. Immunity, 1999. **11**(5): p. 615-23.
72. Shibuya, K., et al., *CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1829-39.
73. Ralston, K.J., et al., *The LFA-1-associated molecule PTA-1 (CD226) on T cells forms a dynamic molecular complex with protein 4.1G and human discs large*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33816-28.
74. Reymond, N., et al., *DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1331-41.
75. Dardalhon, V., et al., *CD226 is specifically expressed on the surface of*

- Th1 cells and regulates their expansion and effector functions.* J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1558-65.
76. Cella, M., et al., *Loss of DNAM-1 contributes to CD8+ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection.* Eur J Immunol, 2010. **40**(4): p. 949-54.
77. Stegmann, K.A., et al., *Interferon alpha-stimulated natural killer cells from patients with acute hepatitis C virus (HCV) infection recognize HCV-infected and uninfected hepatoma cells via DNAX accessory molecule-1.* J Infect Dis, 2012. **205**(9): p. 1351-62.
78. Gilfillan, S., et al., *DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors.* J Exp Med, 2008. **205**(13): p. 2965-73.
79. Gertner-Dardenne, J., et al., *Human Vgamma9Vdelta2 T cells specifically recognize and kill acute myeloid leukemic blasts.* J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4701-8.
80. Constant, P., et al., *Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands.* Science, 1994. **264**(5156): p. 267-70.
81. Halary, F., et al., *Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors.* Eur J Immunol, 1997. **27**(11): p. 2812-21.
82. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells.* Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 48-57.
83. Boles, K.S., et al., *A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC.* Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 695-703.
84. Levin, S.D., et al., *Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function.* Eur J Immunol, 2011. **41**(4): p. 902-15.
85. Keir, M.E. and A.H. Sharpe, *The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity.* Immunol Rev, 2005. **204**: p. 128-43.
86. Stanietsky, N., et al., *Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR.* Eur J Immunol, 2013.
87. Kennedy, J., et al., *A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM).* J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 725-34.

88. Wolk, K., et al., *IL-22 increases the innate immunity of tissues*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 241-54.
89. Takeuchi, A., et al., *CRTAM confers late-stage activation of CD8+ T cells to regulate retention within lymph node*. *J Immunol*, 2009. **183**(7): p. 4220-8.
90. Yeh, J.H., S.S. Sidhu, and A.C. Chan, *Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam*. *Cell*, 2008. **132**(5): p. 846-59.
91. Dessarthe, B., et al., *CRTAM receptor engagement by Necl-2 on tumor cells triggers cell death of activated Vgamma9Vdelta2 T cells*. *J Immunol*, 2013. **190**(9): p. 4868-76.
92. Garay, E., et al., *CRTAM: A molecule involved in epithelial cell adhesion*. *J Cell Biochem*, 2010. **111**(1): p. 111-22.
93. Patino-Lopez, G., et al., *Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes*. *J Neuroimmunol*, 2006. **171**(1-2): p. 145-55.
94. Ruble, D.M. and D.N. Foster, *Molecular characterization of a new member of the immunoglobulin superfamily that potentially functions in T-cell activation and development*. *Immunogenetics*, 2000. **51**(4-5): p. 347-57.
95. Du Pasquier, L., *Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity*. *C R Biol*, 2004. **327**(6): p. 591-601.
96. Zucchetti, I., et al., *Origin and evolution of the vertebrate leukocyte receptors: the lesson from tunicates*. *Immunogenetics*, 2009. **61**(6): p. 463-81.
97. Viertlboeck, B.C. and T.W. Gobel, *The chicken leukocyte receptor cluster*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011. **144**(1-2): p. 1-10.
98. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types*. *J Immunol*, 2005. **175**(1): p. 385-93.
99. Viertlboeck, B.C., et al., *Characterization of the chicken CD200 receptor family*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(7): p. 2097-105.
100. Zhang, S., et al., *Competition of Cell Adhesion and Immune Recognition: Insights into the Interaction between CRTAM and Nectin-like 2*. *Structure*, 2013. **21**(8): p. 1430-9.

101. Rubinstein, R., et al., *Functional classification of immune regulatory proteins*. Structure, 2013. **21**(5): p. 766-76.
102. Alvarez, Y., et al., *The CD300a (IRp60) inhibitory receptor is rapidly up-regulated on human neutrophils in response to inflammatory stimuli and modulates CD32a (FcγRIIa) mediated signaling*. Mol Immunol, 2008. **45**(1): p. 253-8.
103. Gobel, T.W., C.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*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1743-7.
104. Chen, C.H., et al., *T cell receptors and T cell development*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **212**: p. 37-53.
105. Koskinen, R., et al., *The structure of avian CD5 implies a conserved function*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4943-50.
106. 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*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4485-94.
107. Chen, C.H., et al., *TCR3: a third T-cell receptor in the chicken*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2351-5.
108. Chen, C.L., et al., *Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes*. Eur J Immunol, 1988. **18**(4): p. 539-43.
109. Kasahara, Y., C.H. Chen, and M.D. Cooper, *Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and in vivo priming*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2230-6.
110. Bucy, R.P., C.H. Chen, and M.D. Cooper, *Analysis of gamma delta T cells in the chicken*. Semin Immunol, 1991. **3**(2): p. 109-17.
111. Gobel, T.W., B. Kaspers, and M. Stangassinger, *NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken*. Int Immunol, 2001. **13**(6): p. 757-62.

9. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Göbel, der es mir ermöglicht hat, in seinem Labor und unter seiner Leitung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Seine hervorragende fachliche Betreuung und seine konstruktiven Hilfestellungen waren von unschätzbarem Wert für das Gelingen dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Stangassinger bedanke ich mich ganz herzlich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die guten Arbeitsbedingungen.

Besonderen Dank möchte ich auch Frau PD Dr. Birgit Viertlböck, Frau PD Dr. Sonja Härtle und Herrn Prof. Dr. Kaspers für ihre stete Bereitschaft zur Diskussion und ihre kritischen Beiträge aussprechen. Sie halfen mir dadurch, mein Themengebiet aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten.

Beatrice Sperling, Marina Kohn, Beatrice Schaerer und Ingrid Riehl danke ich für die gute Einarbeitung und die fortwährende Hilfestellung bei allen methodischen Problemen.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Deeg und Kaspers für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ferner meiner Arbeitsgruppe für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima und die kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Mitstreitern, die in privaten und fachlichen Fragen immer ein offenes Ohr und aufbauenden Zuspruch für mich hatten.

Barbara Schreiner, Julia Schermuly und Christian Straub möchte ich für ihre Freundschaft und die schöne gemeinsame Zeit danken.

Bei Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka bedanke ich mich für die Betreuung der Tiere und die gute Zusammenarbeit im Tierstall.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, möchte ich für die fortwährende seelische und finanzielle Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums danken.

Ganz besonders möchte ich meinem Vater und meiner Mutter für ihre Wärme, ihre Anteilnahme und ihre Rückendeckung danken, die es mir erst möglich

machten, in manchen schwierigen Situationen auf meinem Weg zu bleiben.

Auch möchte ich meinen Geschwistern, meinen größten Vertrauten und ständigen Wegbegleitern, für ihre Loyalität und ihre Anteilnahme danken.

Ich kann mich glücklich schätzen, eine so tolle Familie zu haben!