

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Institut für Biowissenschaften

Fachgebiet: Genetik

Betreuer: Prof. Dr. Tom Goldammer

M.Sc Fabio Sarais

(e-mail: sarais@fhn-dummerstorf.de)

In vitro characterisation of factors controlling the innate immune response in Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)

The innate immune system is the first line of defence against infections, responding promptly to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In terms of traits and components, the innate immune system of teleosts is similar to that of mammals. In addition, teleosts and other fish rely heavily on innate immune responses to fight infections. Despite the fact that gene or protein orthology and conservation allow for function similarity, the Whole Genome Duplication (WGD) that occurred early in the life of ray-finned fishes permitted the formation of paralog genes with novel functions in fish. Additionally, salmonids underwent an extra Whole Genome Duplication, which resulted in more gene copies. In Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), around half of these genes have been preserved as probably functional duplicates, whereas 66 percent of the remaining singletons appear to have a pseudogenised duplicate. As a result of the complexity of their genome, functional concerns of trout genes must first be structural and functionally analysed. Therefore, the aim of this thesis was focused towards the characterisation of selected factors able to regulate the innate immune response of rainbow trout and in salmonid cell models. *In vivo* studies have been carried out on magnetically sorted living cells of myeloid and lymphoid origin from head kidney of naïve trout, upon stimulation with inactivated *Aeromonas salmonicida*. A panel of 43 genes revealed a prominent reduction of cytokines and NF- κ B signalling in the challenged groups, indicating the inhibitory role of *A. salmonicida* stimulation on the early innate immune response. For this reason, the NF- κ B and the JAK/STAT pathway have been investigated and two families of factors, PIAS and NKIRAS proteins, have been studied in different tissues and cell populations, upon different stimuli. *In vitro* overexpression experiments of NKIRAS2a and NKIRAS2b revealed a new sub-functionalisation of both transcript variants, apparently able to enhance the NF- κ B activation and downstream gene expression. Knockout experiments with CRISPR/Cas9 method highlighted the essential role of PIAS factors in salmonid derived cell line, leading the cells to death. Per contra, overexpression experiments indicated a strong inhibitory effect on the NF- κ B and on JAK/STAT pathways downstream gene.

Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen und reagiert schnell auf „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs). In Bezug auf Eigenschaften und Komponenten ähnelt das angeborene Immunsystem der Knochenfische dem der Säugetiere. Darüber hinaus spielt die angeborene Immunantwort eine große Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen bei Teleostier und anderen Fischen. Trotz der Tatsache, dass Gen- oder Proteinorthologie eine Funktionsähnlichkeit ermöglichen, hat die vollständige Genomverdopplung (Whole Genome Duplication, WGD), die früh in der Evolution der Strahlenflossler auftritt, die Bildung zahlreicher paraloger Gene mit neuen Funktionen in Fischen ermöglicht. Zusätzlich trat bei den Salmoniden eine zweite vollständige Genomverdopplung auf, was zu weiteren Genkopien führte. Bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) ist etwa die Hälfte dieser Gene als funktionelle Duplikate erhalten geblieben, während 66 Prozent der verbleibenden Singletons ein pseudogenisiertes Duplikat zu haben scheinen. Aufgrund der Komplexität ihres Genoms müssen die funktionellen Bestandteile der Forellengene zunächst strukturell und funktionsabhängig analysiert werden. Daher konzentrierte sich das Projekt auf die Charakterisierung ausgewählter Faktoren, die eine Rolle bei der Regulation der angeborene Immunantwort von Regenbogenforellen und Salmoniden Zellmodellen spielen. *In vivo*-Studien wurden an mittels MACS separierten lebenden Zellen myeloischen und lymphoiden

Ursprungs aus der Kopfniere naiver Forellen durchgeführt, nachdem diese mit inaktivierten *Aeromonas salmonicida* stimuliert worden waren. Ein Gen-Panel von 43 ausgewählten Genen zeigte eine deutliche Verringerung von Zytokinen und NF- κ B-Signalen in den stimulierten Gruppen, was auf eine hemmende Wirkung von *A. salmonicida* auf die frühe angeborene Immunantwort hinweist. Aus diesem Grund wurden neben dem NF- κ B- und dem JAK/STAT-Signalweg, auch zwei Proteinfamilien (PIAS- und NKIRAS-Proteine) in verschiedenen Geweben, Zellpopulationen und bei unterschiedlichen Stimuli untersucht. In-vitro-Überexpressionsversuche von NKIRAS2a und NKIRAS2b ergaben eine neue Teilfunktionalität beider Transkriptvarianten, die offenbar die NF- κ B-Aktivierung und die nachgeschaltete Genexpression verstärken kann. Knockout-Experimente mittels der CRISPR/Cas9-Methode unterstrichen die essentielle Rolle der PIAS-Faktoren in Salmoniden-Zelllinien, die letztendlich zum Zelltod führen. Im Gegensatz dazu wiesen Überexpressionsversuche jener Faktoren auf eine starke hemmende Wirkung auf den NF- κ B-Signalweg und auf nachgeschaltete Gene des JAK/STAT-Signalwegs hin.