

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
des Veterinärwissenschaftlichen Departments  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. T. Göbel

## **Der Leukozyten Rezeptor Komplex des Bankivahuhns**

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

von  
Katharina Lochner  
aus  
Peißenberg

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Göbel

Koreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. Erhard  
Prof. Dr. Kaltner  
Univ.-Prof. Dr. Matis  
Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

**Für meine Mutter**

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Ig-ähnliche Rezeptoren .....	3
2.2	LRC .....	4
2.2.1	ILT .....	5
2.2.2	KIR und GPVI.....	5
2.2.3	LAIR .....	6
2.2.4	Fc $\alpha$ RI (CD89) und NKp46 .....	7
2.3	LRC des Huhns.....	8
3	Publikation.....	11
4	Diskussion.....	18
5	Zusammenfassung.....	21
6	Summary.....	22
7	Literaturverzeichnis .....	23
8	Persönliche Daten.....	27

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
BAC	artifizielles Chromosom (engl. Bacterial Artificial Chromosome)
CEACAM	karzinoembryonisches Antigen-abhängiges Zell-Adhäsionsmolekül (engl. Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule)
CHIR	Hühner Ig-ähnlicher Rezeptor (engl. Chicken Ig-like Receptor)
Fc $\alpha$ R	Fc $\alpha$ Rezeptor
Fc $\epsilon$ R	Fc $\epsilon$ Rezeptor
GPVI	Glycoprotein VI
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
ILT	Ig-ähnliches Transkript
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes inhibierendes Motiv
KIR	Killerzellen Ig-ähnlicher Rezeptor
LAIR	Leukozyten assoziierter Ig-ähnlicher Rezeptor
LILR	Leukozyten Ig-ähnlicher Rezeptor
LRC	Leukozyten Rezeptor Komplex (engl. Leukocyte Receptor Complex)
LSL	Lohmann Leghorn (engl. Lohmann selected Leghorn)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
MIR	Monozyten/Makrophagen Ig-ähnlicher Rezeptor
NITR	neuer Immun-Typ Rezeptor
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NKC	natürlicher Killer Gen-Komplex (engl. Natural Killer Gene-Complex)
NKp	natürliches Killerprotein
PIR	gepaarter Ig-ähnlicher Rezeptor (engl. Paired Ig-like Receptor)
RJF	Bankivahuhn (engl. Red Jungle Fowl)
SH2	Src Homologe 2
SHP	SH2-beinhaltende Proteintyrosinphosphatase
SIGLEC	Sialinsäure-bindendes Ig-ähnliches Lektin (engl. Sialic acid binding Ig- like Lectins)
ITSM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Wechselmotiv (engl. Immune Receptor Tyrosin-based Switch Motif)

## 1 Einleitung

Leukozyten werden durch entgegen gesetzte Signalwege reguliert. Die Interaktion von Oberflächenrezeptoren mit ihren Liganden löst eine Hemmung oder Aktivierung der Zellantwort aus. Zwei große Gruppen strukturell unterschiedlicher Moleküle sind für die Vermittlung dieser Regulation verantwortlich. Dies sind die Mitglieder der C-Typ Lektin-Superfamilie im natürlichen Killer Gen-Komplex (NKC) [1], beim Mensch auf Chromosom 12p13.1 [2], und die der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) im Leukozyten Rezeptor Komplex (LRC) auf Chromosom 19q13.4 [3].

Der LRC des Menschen umfasst 1Mb und beinhaltet 45 verschiedene Gensequenzen, von denen 30 als Immunglobulin (Ig) -ähnliche Rezeptorgene identifiziert wurden [4,5]. Es sind dies die Familien der Ig-ähnliche Transkripte (ILT), Killerzellen Ig-ähnliche Rezeptoren (KIR), und Leukozyten assoziierten Ig-ähnliche Rezeptoren (LAIR) sowie das Glycoprotein VI (GPVI), das natürliche Killerprotein (NKp) 46 und der Fc $\alpha$  Rezeptor (Fc $\alpha$ R) I [4]. Am zentromeren Ende des Komplexes werden neue Gene kodiert, die sogenannten LENG, die einen anderen Ursprung und strukturell keinen Bezug zu Ig-ähnlichen Rezeptoren haben [4].

Weiter zentromer des eigentlichen LRC liegen Gene die verwandte Moleküle kodieren. Dieser ganze Bereich wird deshalb als „erweiterter (extended) LRC“ bezeichnet und beinhaltet zusätzliche Ig-ähnliche Genfamilien wie die karzinoembryonischen Antigen-abhängigen Zell-Adhäsionsmoleküle (CEACAM) und die Sialinsäure-bindenden Ig-ähnlichen Lektine (SIGLEC). CEACAM spielen eine Rolle bei verschiedenen Vorgängen, wie Angiogenese, Tumorentwicklung, Insulinregulation und Apoptose. Des weiteren gibt es unter ihnen Rezeptoren für Pathogene wie Neisseria, Haemophilus, Escherichia und Salmonellen sowie den Maus Hepatitis Virus, welche die Bindung an CEACAM zur Transzytose und Immunmodulation verwenden [6,7]. Wie der Name schon sagt, sind SIGLEC Rezeptoren für bestimmte Zuckerreste. Sie kommen als Adhäsionsmoleküle auf verschiedenen Leukozyten vor wie z.B. Siglec-1 (CD169) auf Makrophagen [8] und Siglec-2 (CD22) auf B-Zellen [9].

Die Ig-ähnlichen Rezeptoren des LRC kommen in drei Varianten vor. Entweder sind sie mit Immunrezeptor Tyrosin-basierenden inhibierenden Motiven (ITIM) ausgestattet und wirken somit hemmend auf die Zelle oder haben durch bestimmte Aminosäuren (AS) die Möglichkeit Adaptermoleküle mit Immunrezeptor Tyrosin-

basierenden aktivierenden Motiven (ITAM) [10] zu binden, welche die Zelle aktivieren. Zusätzlich gibt es Rezeptoren, die über hemmende und aktivierende Eigenschaften in Kombination verfügen, was diese potentiell bifunktional macht.

Eine zum menschlichen LRC homologe Region liegt bei der Maus auf Chromosom 7, wobei keine den KIR entsprechenden Gene vorhanden sind [4]. Auch in anderen Tierarten konnten homologe Genfamilien nachgewiesen werden. So wurden z.B. in verschiedenen Knochenfischen neue Immun-Typ Rezeptoren (NITR) gefunden [11], die funktionelle Homologe der KIR und ILT sind [12]. Untersuchungen an *Ciona intestinalis* geben Hinweise darauf, dass der LRC der Wirbeltiere aus einer einzelnen Vorläuferregion entstanden ist, die sich nach zwei Duplikationen des gesamten Genoms in eine Tetrade von Genloci aufgeteilt hat, und die als verwandte Region in den modernen Tunicaten zu finden ist [13].

Beim Huhn findet sich ein dem LRC homologer Bereich auf Mikrochromosom 31. Dieser Genort enthält zahlreiche Vertreter der Hühner Ig-ähnlichen Rezeptoren (CHIR), einer hochpolymorphen Genfamilie. Wie es für Mitglieder der IgSF charakteristisch ist, gibt es hemmende, aktivierende und bifunktionale CHIR [14]. Ein erster Versuch die genomische Organisation des LRC des Huhns näher zu beschreiben wurde anhand von artifiziellen Chromosomen (BAC) -Klonen eines Huhns der Linie Lohmann Leghorn (LSL) vorgenommen [15]. Die Untersuchung des LRC beim Bankivahuhn (RJF) ist ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Bedeutung dieses genomischen Bereiches und der hier kodierten Rezeptoren.

## 2 Literatur

### 2.1 Ig-ähnliche Rezeptoren

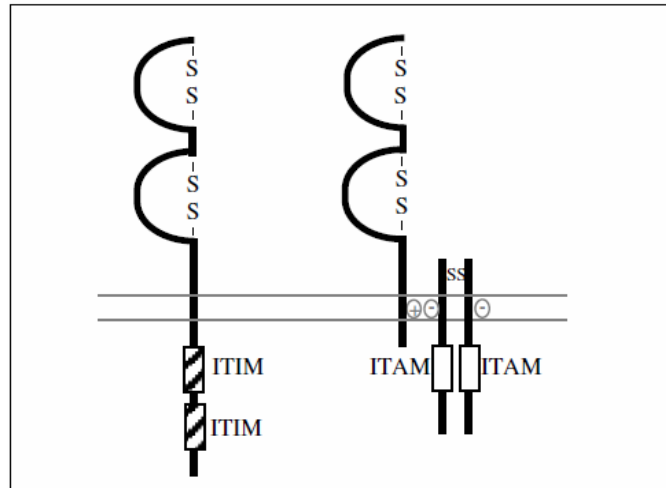
Ig-ähnliche Rezeptoren sind Mitglieder der IgSF, welche aus vielen strukturell ähnlichen Rezeptoren besteht [16,17] und an der Regulierung des Immunsystems von Vertebraten beteiligt ist [18,19]. Diese Rezeptoren sind auf der Zelloberfläche exprimierte Proteine und haben mit anderen Mitgliedern der IgSF mehrere Eigenschaften gemein z.B. das Vorhandensein von spezifischen Ig-Domänen, Disulfidbrücken zwischen den Ketten, abwechselnde hydrophobe und hydrophile Reste und die für eine spezielle Faltung wichtigen strukturellen Besonderheiten [20,21]. Ig-ähnliche Rezeptoren haben eine oder mehrere extrazelluläre Ig-Domänen, einen Transmembranen sowie einen langen oder kurzen zytoplasmatischen Anteil [4]. Die extrazelluläre Region besteht aus einer verschiedenen Anzahl von Ig-Domänen. Eine Ig-Domäne setzt sich aus zwei  $\beta$ -Faltblättern zusammen, welche durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Je nach Anzahl der  $\beta$ -Ketten, aus denen die Faltblätter bestehen, und der Länge der Sequenzen zwischen den Disulfidbrücken unterscheidet man V-, C1- und C2-Domänen. In antigenerkennenden Proteinen wie dem T-Zellrezeptor kommen die variablen V-Domänen, in Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) -Proteinen C1-Domänen und in Ig-ähnlichen Rezeptoren nur C2-Domänen vor [20].

Aktivierende und inhibierende Rezeptoren im LRC unterscheiden sich in ihren Transmembranen und zytoplasmatischen Anteilen. Aktivierende Rezeptoren besitzen einen kurzen zytoplasmatischen Teil und eine positiv geladene AS (Arginin oder Lysin) in der Transmembranen Domäne, die an den negativ geladenen Transmembranen Aspartatrest eines Adaptormoleküls binden kann, welches ITAM besitzt. Je nach Rezeptor handelt es sich dabei um Assoziierung mit DAP12 [22], der  $\gamma$ -Kette des Fc $\epsilon$ R oder CD3 $\zeta$  [23]. Ein ITAM besteht aus einer Folge von vier AS, wobei Tyrosin und Leucin den Rahmen für zwei beliebige AS bilden (YxxL). Diese Abfolge wiederholt sich getrennt durch sechs bis acht AS [24]. Die Peptide der ITAM interagieren mit den Tyrosinkinase Syk oder ZAP-70, welche weitere Kaskaden zur Zellaktivierung auslösen [25].

Die inhibitorischen Rezeptoren haben keine positive Ladung im Transmembranen Bereich sondern einen langen zytoplasmatischen Teil mit ein bis vier ITIM. Dieses Motiv ist eine Sequenzfolge von sechs AS, wobei die erste Isoleucin, Valin, Leucin



oder Serin sein kann. Es folgt Tyrosin auf eine beliebige AS und nach zwei wiederum beliebigen AS bildet Valin oder Leucin den Abschluß (I/V/L/SxYxxL/V) [26]. Durch Ligandenbindung werden die Tyrosinreste im ITIM phosphoryliert und können dann zytoplasmatische Phosphatasen mit einer Src homology 2 (SH2)-Domäne binden, welche schließlich durch Dephosphorylierung aktivierende Kaskaden unterbrechen [25].



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Ig-ähnlichen Rezeptoren mit extrazellulären Ig-Domänen (hier beispielhaft zwei) stabilisiert durch Disulfidbrücken (SS). Der inhibitorische Rezeptor (links) mit ITIM (hier beispielhaft zwei). Der aktivierende Rezeptor (rechts) mit einer positiv geladenen AS im transmembranen Bereich, durch die eine Assoziierung mit einem homodimeren ITAM-haltigen Adaptermolekül eingegangen werden kann. Abbildung entnommen aus der Dissertation von B. Viertböck [27].

## 2.2 LRC

Der LRC, der beim Mensch auf Chromosom 19q13.4 [3] und bei der Maus auf Chromosom 7 zu finden ist, erstreckt sich über 1Mb und beinhaltet 30 Ig-ähnliche Rezeptorgene [4,5].

Basierend auf genetischer Organisation und Struktur können diese in vier Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bilden die ILT, die zweite besteht aus KIR und GPVI, eine dritte Gruppe stellen LAIR dar und als viertes können NKp46 und der Rezeptor für Fc $\alpha$ RI einander zugeordnet werden [4]. Bei ihnen allen kommen nur extrazelluläre Ig-Domänen vom C2-Typ vor [20].

### 2.2.1 *ILT*

ILT, auch bezeichnet als Leukozyten Ig-ähnliche Rezeptoren (LILR) oder Monozyten/Makrophagen Ig-ähnliche Rezeptoren (MIR), sind potente Modulatoren von Immunantworten wie auch die homologen gepaarten Ig-ähnlichen Rezeptoren (PIR) der Maus. Die ILT-Familie von 13 Genen liegt in zwei spiegelverkehrt duplizierten Klustern vor und ist durch ein Paar LAIR-Gene und die unabhängige Genfamilie der LENG getrennt [1,28]. Jeder der beiden Kluster umfasst 150 kb der Gensequenz zentromer zur KIR-Familie [4].

Es gibt sechs Gene für potentiell aktivierende (LILRA), fünf Gene für hemmende (LILRB) Rezeptoren und zwei Pseudogene [5]. ILT werden auf allen Zellen der myeloiden Linie sowie auf den plasmazytotischen Dendritischen Zellen [29] teilweise auf NK-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und LILRB1 auf B-Zellen exprimiert. ILT besitzen vier extrazytoplasmatische Ig-Domänen, mit Ausnahme von ILT3, das nur zwei hat. Hemmende Rezeptoren verfügen über vier ITIM, mit denen sie die SH2-beinhaltende Proteintyrosinphosphatase (SHP) -1 [30] rekrutieren. Diese unterbricht durch Phosphorylierung des carboxyterminalen Tyrosinrestes in Src-Kinasen deren katalytische Aktivität [31]. Aktivierende ILT haben Arginin im transmembranen Bereich und interagieren mit der  $\gamma$ -Kette des Adaptermolekül Fc $\epsilon$ RI [32]. Die einzigen bekannten Liganden für einige ILT sind MHC-Klasse I-Moleküle [19]. ILT binden an die stärker konservierte  $\alpha 3$ -Untereinheit.

Betrachtet man die genomische Organisation und Homologie mit murinen PIR scheint sich der ILT-Genort vor dem KIR-Kluster entwickelt zu haben [4]. Im Gegensatz zu KIR haben die ILT begrenzte allelische Varianz [33] und konservierte Genanzahl zwischen Haplotypen mit dem Sonderfall des funktionellen LILRA3, der in manchen Individuen fehlt [1,28]. ILT Genen entsprechen die PIR Gene der Maus. Sie sind nah miteinander verwandt und könnten von gemeinsame Vorfahren abstammen [4].

### 2.2.2 *KIR und GPVI*

KIR-Gene liegen im LRC zwischen dem Gen für den Fc $\alpha$ R und den ILT-Genen [34]. Diese Genfamilie beansprucht ca. 140 kb und besteht aus maximal 16 Mitgliedern und zwei Pseudogenen [4]. KIR werden auf Natürlichen Killer (NK) -Zellen sowie auf bestimmten T-Zellpopulationen exprimiert [5] und binden MHC-Klasse I-Moleküle und zwar an den hochpolymorphen  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Untereinheiten [35].

KIR besitzen zwei oder drei extrazelluläre Ig-Domänen, wonach sie entweder als KIR2D oder KIR3D bezeichnet werden. Es gibt sowohl hemmende als auch aktivierende Varianten. Deren Namen wird aufgrund der unterschiedlichen Länge des intrazellulären Anteils bei hemmenden Rezeptoren ein L für das englische „long“ (z.B. KIR2DL) und bei aktivierenden ein S für das englische „short“ (z.B. KIR2DS) hinzugefügt. KIR2DL4 bildet eine Ausnahme, da er sowohl hemmende als auch aktivierende Eigenschaften hat [36]. Die aktivierenden Rezeptoren verfügen über ein geladenes Lysin im transmembranen Teil und assoziieren mit Adaptermolekül DAP12, welches ITAM besitzt. Sie lösen in letzter Konsequenz Zytotoxizität und/oder Zytokin-Freisetzung aus [22]. Die hemmenden KIR können mit den ITIM SHP-1 und SHP-2 assoziieren und die Zytotoxizität verhindern [37]. Hemmende Rezeptoren unterbrechen intrazelluläre Aktivierung, wenn MHC-Klasse I korrekt auf der Zielzelle exprimiert wird [38].

KIR können in Haplotypgruppe A und B eingeteilt werden [39]. Gruppe A besteht generell aus einfacheren Rezeptoren, die meistens nur hemmende KIR darstellen während die Rezeptoren der Gruppe B im allgemeinen variabler sind und potentiell aktivierende KIR enthalten [5]. Im LRC der Maus fehlen zu den KIR homologe Gene. Das Gen für den Kollagenrezeptor GPVI liegt neben dem Gen für NKp46 am telomeren Ende des LRC, und ein homologes Gen kommt im LRC der Maus vor [4]. Dieser aktivierende Rezeptor hat zwei extrazytoplasmatische Ig-Domänen, ein positiv geladenes Arginin im transmembranen Bereich und assoziiert mit der  $\gamma$ -Kette des  $Fc\epsilon R1$ . GPVI wird auf Thrombozyten von Mensch und Maus exprimiert [40].

### 2.2.3 LAIR

Die homologen LAIR Gene 1 und 2 kodieren angrenzend an den ILT-Kluster in unterschiedlicher transkriptionaler Orientierung [28].

LAIR-1 besitzt zwei extrazelluläre Ig-C2-Domänen und zwei ITIM im zytoplasmatischen Anteil. LAIR-2 ist zwar zu 84% homolog, besitzt aber keinen transmembranen Teil und scheint somit ein löslicher Rezeptor zu sein. LAIR-1 wird auf fast allen Immunzellen exprimiert und hemmt z.B. die zytotoxische Aktivität von T-Zellen durch Quervernetzung mit CD3 [41], oder die Kalziummobilisierung in B-Zellen durch Interaktion mit dem B-Zell Rezeptor [42]. Neben dem aktivierenden GPVI [43] ist LAIR-1 der zweite Kollagen-bindende Rezeptor im LRC. In vitro kann mit ihm die Aktivierung von primären Immunzellen gehemmt werden.

LAIR-2 bindet auch Kollagen und könnte als löslicher Rezeptor durch die Besetzung von Kollagenbindungsstellen LAIR-1 negativ regulieren [44].

Der ILT/LAIR Locus hat eine ausgedehnte inverse Duplikation durchgemacht. Da Mäusen das LAIR-2 Gen fehlt, fand diese Duplikation wohl eher später in der Evolution statt [17,45].

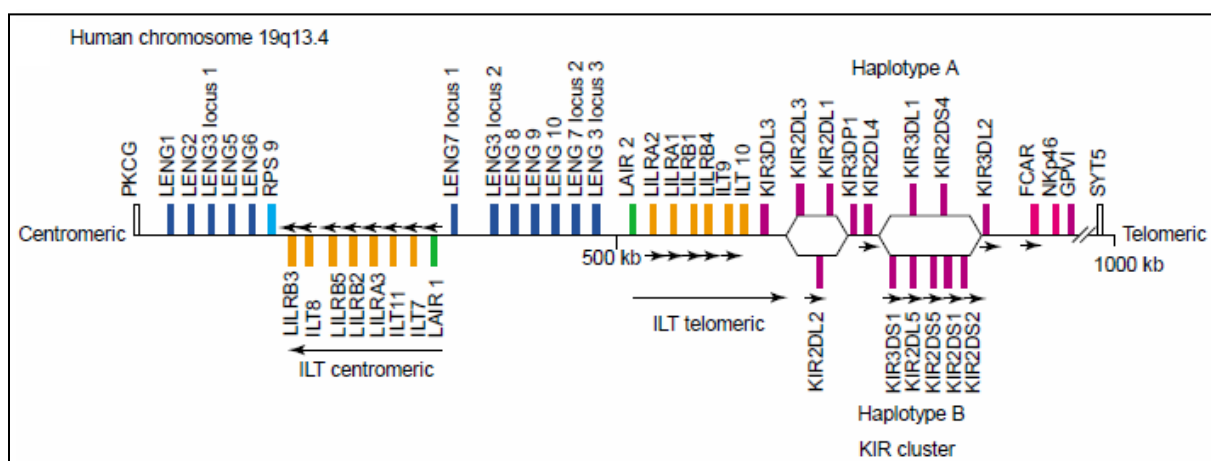
#### 2.2.4 *FcαRI (CD89) und NKp46*

Das *FcαRI* Gen befindet sich telomer des KIR-Klusters [46].

Der Rezeptor besitzt zwei extrazelluläre Ig-Domänen, ein positiv geladenes Arginin im transmembranen Teil und einen kurzen zytoplasmatischen Rest. Er ist somit ein aktivierender Rezeptor und interagiert mit dem Adaptermolekül *FcεR* [47].

*FcαRI* wird auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert [48] und bindet IgA. Hierbei unterscheidet er nicht zwischen IgA-Subtyp 1 und 2 sowie der sekretierten bzw. monomeren oder polymeren Form [49,50].

Das *NKp46*-Gen liegt im LRC neben dem Gen für *FcαRI* und ist als Homolog im LRC der Maus vorhanden [4]. Auch dieses Protein besitzt zwei extrazelluläre Ig-Domänen einen kurzen zytoplasmatischen Rest ohne Signalmotive und transmembran einen positiv geladenen Argininrest durch den der Rezeptor mit den ITAM besitzenden Adaptermolekülen *CD3ζ* und *FcεR* assoziiert. *NKp46* ist ein wichtiger Rezeptor zur Erkennung und Eliminierung von tumor- und virusinfizierten Zellen, er bindet z.B. Hämagglutinin des Influenza Virus [51,52].



**Abb. 2-1:** Organisation des LRC auf dem menschlichen Chromosom 19q13.4. Der Komplex ist durch vier Multigenfamilien charakterisiert, die Ig-ähnliche Rezeptoren kodieren. Erstens die Familie der ILT (auch bezeichnet als LILR) (orange), zweitens die Familie der KIR und GPVI (lila), drittens die Familie der LAIR (grün), viertens *FcαRI* und *NKp46* (rosa). Die neuen LENG-Gene (blau) sind strukturell nicht mit den Ig-ähnlichen Rezeptoren verwandt. Abbildung modifiziert nach Martin et al. [4]

### 2.3 LRC des Huhns

Eine zum menschlichen LRC homologe Region ist im Hühnergenom auf Mikrochromosom 31 lokalisiert. An diesem Genort befindet sich die Familie der CHIR-Gene [53,14]. CHIR gehören zur IgSF und besitzen wie alle Mitglieder dieser Genfamilie nur Ig-C2-Domänen. Man kann die CHIR in drei große Gruppen einteilen: aktivierende (CHIRA1, 2), hemmende (CHIRB1-6) und bifunktionale (CHIRAB1-3) Rezeptoren. Die hemmenden CHIRB besitzen einen langen zytoplasmatischen Teil mit zwei ITIM, während die aktivierenden CHIRA nur einen kurzen zytoplasmatischen Rest haben. Sie verfügen aber über eine positiv geladene AS im transmembranen Bereich, um mit Adaptermolekülen zu assoziieren. Die bifunktionalen Rezeptoren CHIRAB schließlich weisen sowohl hemmende als auch aktivierende Eigenschaften auf [14].

CHIRA, CHIRB und CHIRAB3 haben extrazellulär zwei Ig-Domänen, welche als Ig1-Domäne distal und Ig2-Domäne proximal der Zellmembran bezeichnet werden. Dagegen besitzen CHIRAB1 und CHIRAB2 nur eine Ig1-Domäne. Vergleicht man die Ig1- und Ig2-Domäne eines CHIR, so besteht hier nur ca. 20-25% Identität der AS, während beim Vergleich von Ig1-Domänen bzw. Ig2-Domänen verschiedener CHIR eine Übereinstimmung der AS von ca. 60-90% vorliegt. Sowohl CHIRA als auch CHIRAB besitzen eine positiv geladene AS im transmembranen Teil, entweder Arginin oder Lysin, in charakteristischer Position, was die Möglichkeit bietet mit einem Adaptermolekül zu assoziieren. So bindet z.B. CHIRA2 an die  $\gamma$ -Kette des Adaptermoleküls Fc $\epsilon$ RI, welches aktivierende ITAM besitzt [14].

Alle CHIR außer CHIRAB3 weisen außerdem transmembran einen konservierten Cysteinrest nahe der extrazellulären Domäne auf, der eine Möglichkeit zur kovalenten Disulfidbrückenbindung darstellt. Hierdurch kann z.B. eine Dimerisation stattfinden, wie für CHIRB2 gezeigt werden konnte [54,14]. Dabei ist das Cystein in der transmembranen  $\alpha$ -Helix gegenüber der geladenen AS positioniert. Diese Stellung gibt Grund zur Annahme, dass eine cysteinmedierte Disulfidbrückenbindung die Assoziierung mit einem Adaptermolekül über die positiv geladene AS nicht stört. Im Gegensatz dazu fehlt CHIRA1 das konservierte Arginin oder Lysin. Dieser Rezeptor besitzt aber ein positiv geladenes Histidin 16 AS vom konservierten Cystein entfernt [55]. Diese Lokalisierung bedeutet, dass Cystein und Histidin auf der gleichen Seite der  $\alpha$ -Helix liegen und somit aufgrund der räumlichen Nähe entweder

eine cysteinemedierte Bindung oder eine Assoziierung mit einem Adaptermolekül erfolgen kann [14].

Während CHIRB1 - CHIRB4 zwei intrazytoplasmatische ITIM besitzen [54], wurde bei CHIRB5 ein amino/NH<sub>2</sub>-terminales ITIM und ein carboxyterminales Immunorezeptor Tyrosin-basierendes Wechselmotiv (ITSM) gefunden. Beim ITSM handelt es sich um eine Modifikation des ITIM, in der die erste AS durch ein Threonin ersetzt ist (TxYxxL/V). Im CHIRAB1 findet man transmembran ein positiv geladenes Arginin und im CHIRAB2 ein Lysin. CHIRAB1 und CHIRAB2 besitzen einen langen zytoplasmatischen Teil mit einem carboxyterminalen ITIM. Nähere Untersuchung der Position des NH<sub>2</sub>-terminalen ITIM bei diesen Rezeptoren ergab in der AS-Abfolge einen Wechsel zum Methionin, drei AS vom konservierten Tyrosin entfernt. Diese Anordnung bildet ein YxxM Motiv, welches in aktivierenden Signalmolekülen wie DAP10 zu finden ist [56]. CHIRAB3 besitzt ein ITIM und ein ITSM zusammen mit einem positiven transmembranen Rest [14]. Außer CHIRAB2, der nur auf Makrophagen der Linie BM-2 nachgewiesen wurde, werden CHIR auf verschiedenen Leukozyten wie reifen B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und NK-Zellen exprimiert [14,57].

Über die Liganden der CHIR ist noch nicht viel bekannt. Erst vor kurzem wurde ein CHIRAB mit einer einzelnen extrazellulären Ig-Domäne (CHIRAB1) als hochaffiner FcY-Rezeptor identifiziert und als CHIR-AB1 bezeichnet. Dieser Rezeptor vereint Eigenschaften verschiedener Säuger Fc-Rezeptoren, wie die Expression auf B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen und seine potentielle Bifunktionalität. Allerdings binden nicht alle CHIRAB mit einer Ig-Domäne an IgY. Die Rezeptoren die mit IgY interagieren, unterscheiden sich von denen die keine Bindung eingehen in der Position bestimmter AS der extrazellulären Ig-Domäne [57,58].



## 3 Publikation

Molecular Immunology 47 (2010) 1956–1962



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molimm](http://www.elsevier.com/locate/molimm)

## The red jungle fowl leukocyte receptor complex contains a large, highly diverse number of chicken immunoglobulin-like receptor (CHIR) genes

Katharina M. Lochner, Birgit C. Viertlboeck, Thomas W. Göbel\*

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

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 1 March 2010

Accepted 4 May 2010

Available online 26 May 2010

## Keywords:

Chicken

Leukocyte receptor complex

Ig-like receptor

## ABSTRACT

The chicken Ig-like receptor (CHIR) gene family is located on microchromosome 31, the orthologous region to the mammalian leukocyte receptor complex. CHIR are equally related to the mammalian killer Ig-like receptors and leukocyte Ig-like transcripts, but they occur in a much higher number and diversity. The chicken microchromosome 31 has been neglected in the genome sequence analysis. Here, we provide a first analysis of this region. For this purpose bacterial artificial chromosome (BAC) sequences originating from a single inbred red jungle fowl that served as basis for the chicken genome project were screened for the presence of CHIR sequences and eight BACs were identified as major CHIR containing regions. Since the sequences of these BACs that were available in the database were not complete, sequence gaps were further closed by novel data from the chicken genome project. The entire sequence was aligned into 26 contigs covering 875 kbp that contained 84 functional CHIR and 46 CHIR pseudogenes that were hampered by different reasons such as premature stop codons. The 84 functional CHIR were further categorized into 35 activating (CHIRA), 26 inhibitory (CHIRB) and 23 bifunctional (CHIRAB) genes. A detailed comparison of the annotated sequence taking also into account the previously published CHIR BAC sequence originating from an Lohman selected leghorn chicken revealed that the CHIR locus seems to be a very active region with a high degree of gene reorganization that resembles a constant birth and death evolution. The present report provides a framework for the future completion of the CHIR locus. It further suggests that the entire microchromosome 31 may resemble a locus of extraordinary genomic diversity that is beneficial for the development of a large CHIR repertoire, but that has therefore lost all other genes, where such a diversification would be fatal.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The leukocyte receptor complex located on human chromosome 19q13.4 and mouse chromosome 7 harbours distinct families of Ig-like receptors, including the KIR, LILR and LAIR families (Martin et al., 2002; Volz et al., 2001). The extended LRC further contains gene families such as SIGLECs and CAECAMs, spanning a region of approximately 1 MB (Kelley et al., 2005). The Ig-like receptor families encoded in the LRC can be grouped into receptor families based on their structure, phylogeny and gene organization, and they also share common features. A majority resemble cell surface receptors that are composed of various numbers of extracellular Ig domains of the V or C2 type, a single transmembrane domain that may contain a basic residue (Arg or Lys) important for the association to adaptor molecules and a cytoplasmic domain. A short cytoplasmic domain in combination with a charged transmembrane residue characterizes activating receptors that signal via adaptor molecules

such as the common Fcγ chain, DAP12 or CD3ζ, all containing ITAM. Alternatively, long cytoplasmic domains containing ITIM distinguish inhibitory receptors that deactivate cellular responses through the recruitment of various tyrosine phosphatases such as SHP-1. Within each receptor family, there are multiple members that may share almost identical extracellular domains but are linked to different cytoplasmic domains.

Comparative analyses of this locus and its encoded families within mammals, but also lower vertebrates, and even tunicates have revealed various interesting aspects concerning the genomic organization and flexibility of the LRC. The LRC encoded genes are highly diversified by gene content between haplotypes and polymorphism of individual genes (Parham, 2008). Extremes are represented for example by highly polymorphic human KIR with various gene content and mammalian carnivores where only a single, low polymorphic KIR is present (Hammond et al., 2009). Several gene families with orthologous relation to the mammalian LRC have also been described in bony fish, where there is some structural evidence for the potential of MHC class I binding and recently also in the amphibian *Xenopus laevis* (Gusel'nikov et al., 2010; Stafford et al., 2007; Yoder, 2009; Yoder et al., 2001). Finally,

\* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 3827; fax: +49 89 2180 2552.  
E-mail address: [goebel@lmu.de](mailto:goebel@lmu.de) (T.W. Göbel).



**Table 1**  
Sequence features of CHIR containing BAC clones.

Name	Acc. number	Fragments	Length (bp)
CH261-804	AC213466	18	209,983
CH261-8G14	AC216111	21	191,263
CH261-25F17	AC213384	2	94,277
CH261-141H1	AC216021	12	185,315
CH261-67D1	AC215887	3	27,133
CH261-4021	AC213390	17	178,663
CH261-42L1	AC213385	11	182,428
CH261-95J13	AC216108	18	214,327
Total			1,283,389

the analysis of a tunicate genome derived from *Ciona intestinalis* suggests that the vertebrate LRC originates from a single prevertebrate region that has been dispersed into a tetrad of chromosomal regions by two successive rounds of genome duplications (Zucchetti et al., 2009).

The CHIR locus may represent the most striking example of LRC heterogeneity. It is located on microchromosome 31 and contains a vast number of individual receptor genes that form one huge Ig-like family (Viertlboeck et al., 2004, 2005). The receptors present within this family can be grouped according to several structural features into the prototypic inhibitory (CHIRB) and activating receptors (CHIRA). In addition, so-called CHIRAB combine the charged transmembrane residue with a long cytoplasmic tail containing one to two ITIM, and may therefore reflect bifunctional receptors (Rogers et al., 2008; Viertlboeck et al., 2005). The CHIR ligands remain elusive with the exception of the CHIRAB1, that is a high affinity receptor for chicken IgY and binds to IgY in a manner similar to human IgA (Arnon et al., 2008; Purzel et al., 2009; Viertlboeck et al., 2007, 2009).

The genomic organization of the CHIR locus has been the focus of one study that utilized BAC clones originating from the Lohman selected leghorn (LSL) chicken strain (Laun et al., 2006). Within a 550 kbp region at least 103 CHIR were identified, including 41 pseudogenes. The 1.05 Gb red jungle fowl (RJF) genome sequence, of which approximately 95% have been ordered to specific chromosomes, contains multiple CHIR sequences, however, since the microchromosome 31 could not be assembled, these sequences are all contained in the virtual chromosome “unaligned”. The present report aimed to take advantage of the BAC clone sequences containing CHIR by assembling them into bigger contigs and to annotate the CHIR sequences, thus allowing further comparisons of the CHIR locus and ultimately assembling the entire locus.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sequences

Sequences of eight BACs derived from the genome project that used a single inbred line female RJF were analyzed for CHIR genes (Table 1). In addition, to further close sequence gaps, Blast searches were performed with the end sequences of each clone fragment against the “Gallus gallus” trace archive database (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), and “454 reads”, accessible on

the homepage of the genome center at Washington University (genome.wustl.edu; Gallus gallus-3.0, released 11/09/2008).

### 2.2. Sequence analyses tools

The Lasergene software package (GATC, Konstanz, Germany) was used for sequence assembly and contigs were manually corrected. Genscan analysis (mobyte.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=genscan) was employed to identify CHIR genes in the contigs and successive SMART analysis (smart.embl-heidelberg.de/smart/set\_mode.cgi?NORMAL=1) revealed the domain structure of individual CHIR (Burge and Karlin, 1997; Ponting et al., 1999). The repetitive elements were identified using Repeat Masker (repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker). Phylogenetic trees from the protein sequences from RJF and LSL CHIR were calculated with the MEGA4 program (megasoftware.net) (Kumar et al., 2008). Further sequence searches were performed on the chicken and zebrafish genomes (<http://www.ensembl.org/index.html>). The CHIR gene sequences are provided in supplementary Table 1.

## 3. Results

### 3.1. Identification and assembly of CHIR containing sequence fragments

Within all available BAC clone sequences derived from the RJF genome project eleven clones were identified that harboured fragments of CHIR genes, regardless of the homology being present in introns or exons. Out of these the partial sequences of eight clones became publically available and were included into further analysis. The sequence features of these clones are summarized in Table 1. Since none of the clones was completely assembled each clone consisted of a variety of unordered fragments with different length. A preliminary assembly of all fragments resulted in a high number of contigs with single or only few sequences. In order to extend the sequences and to reduce the total number of contigs, the ends of each contigs were employed to search trace archives database from NCBI and additional sequence reads obtained from the Washington University Genome Center, resulting in additional 65,382 bp.

All available sequence information that was obtained from these different sources, that all originated from a single animal, were assembled into 22 contigs that contained up to 13 different fragments. Only five fragments remained without appropriate homology to other sequences. The entire sequence length of the 26 contigs spanned more than 875 kbp (Fig. 1).

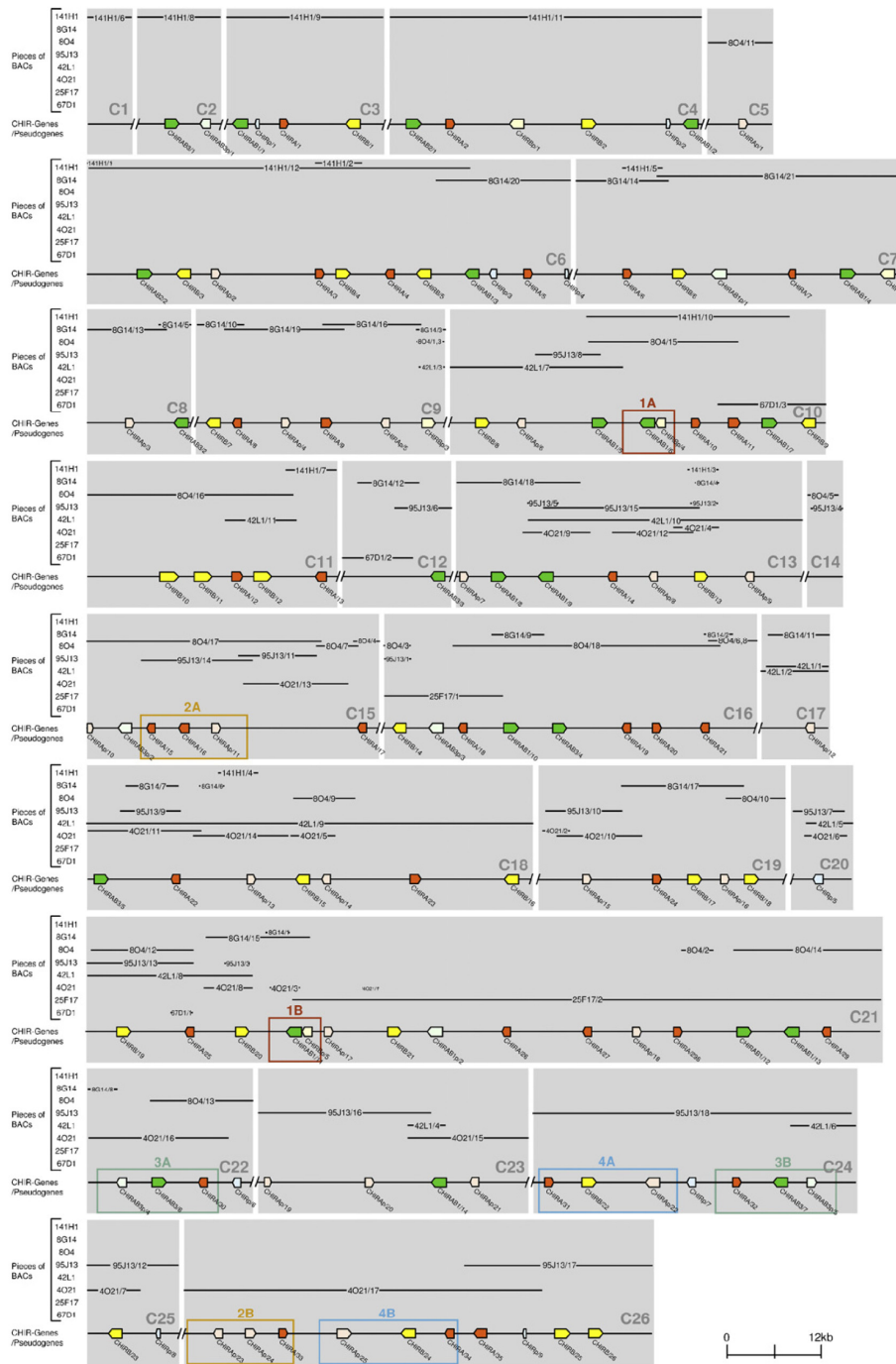
### 3.2. Annotation of CHIR genes

Potential genes within the contigs were identified using the Genscan algorithm. Interestingly, all genes identified within the 875 kbp represented CHIR and no other gene could be located within this region. Subsequently, the exons from each individual CHIR sequence were translated into corresponding amino

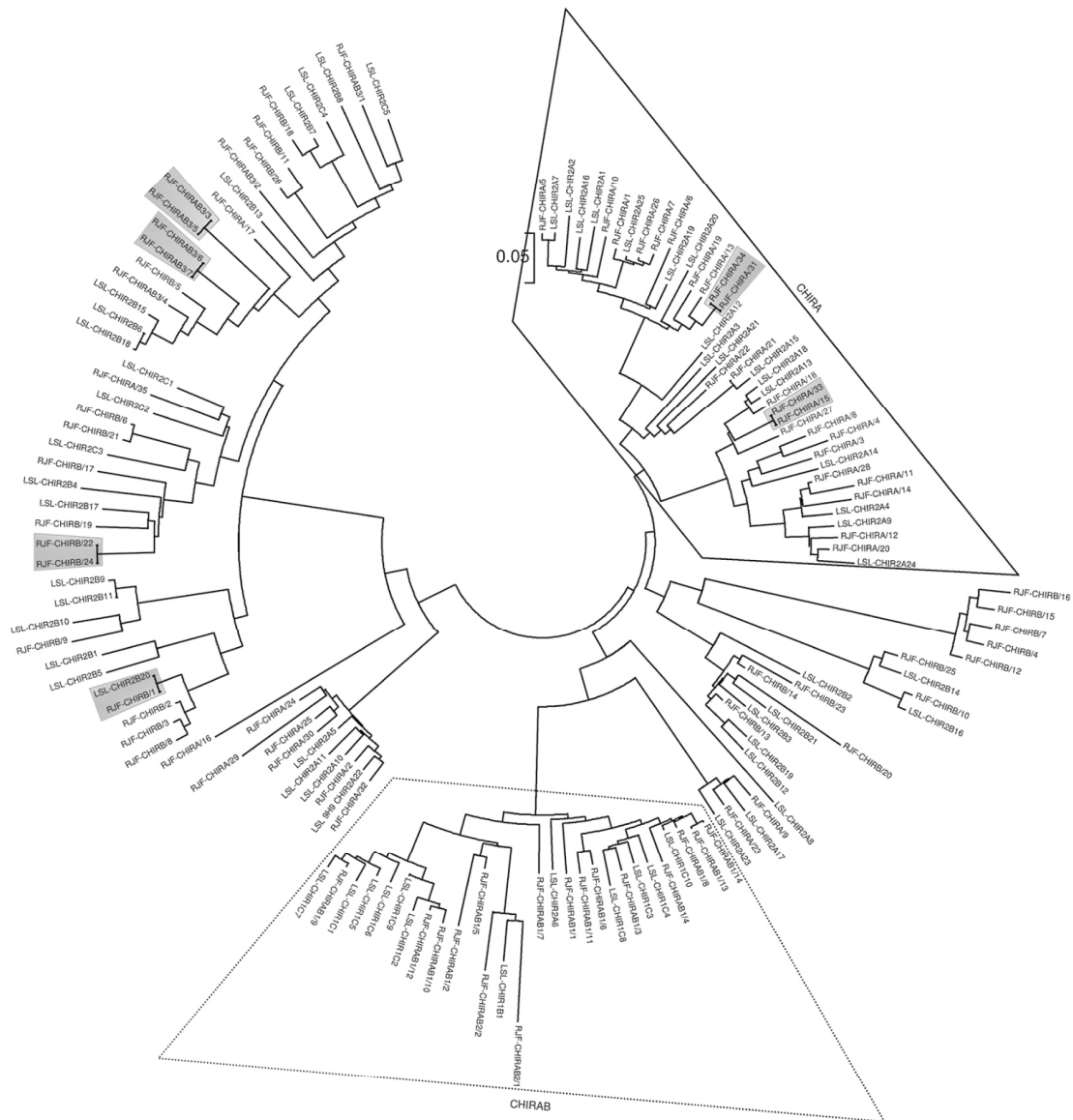
**Table 2**  
Nomenclature of CHIR.

Name	Ig domains	Charged TM residue	Cytoplasmatic region	Putative function	Number <sup>a</sup>
CHIRA	2	Arg	Short	Activating	35
CHIRB	2	None	Long	Inhibitory	26
CHIRAB1	1	Arg	Long	Bifunctional	14
CHIRAB2	1	Lys	Long	Bifunctional	2
CHIRAB3	2	Arg	Long	Bifunctional	7

<sup>a</sup> Representing the number of individual CHIR found for this type.



**Fig. 1.** Partial assembly of the RfJ LRC. The designation of the BAC clones is indicated on the left. Shaded areas represent contigs that are consecutively numbered (C1–C26), where the overlapping fragments of BAC clones are indicated with black lines with the BAC designation and the number of the fragment (e.g. 141H1/6 representing the 6th fragment of clone 141H1). The CHIR genes encoded by the contigs are represented in the bottom part of the shaded areas using arrowheads to indicate the transcriptional orientation and a colouring system to distinguish between CHIRA (red), CHIRB (yellow), CHIRAB (green) with dark colouring and light colouring differentiating between functional and non-functional genes, respectively. Pseudogenes that could not be related to a certain CHIR type are represented as light-blue. The CHIR are also individually labeled using the nomenclature as presented in Table 2 with a “p” indicating a pseudogene and a consecutive number to distinguish individual CHIR. Differently coloured boxes indicate highly homologous regions and are numbered identically with successive letters to indicate their close relationship (e.g. 1A and 1B representing highly homologous regions). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)



**Fig. 2.** Comparison of 146 predicted CHIR. 62 LSL and 84 RJF CHIR were compared using the neighbor-joining tree constructed by MEGA4 with 1000 bootstrap replicates and pairwise gap deletions. CHIR which are identical are displayed in grey shaded boxes. Major branches representing CHIRAB and CHIRA are marked by trapezes.

acid sequences and those were analyzed using the SMART program. The domain structures revealed by this analysis together with manual inspection of characteristic features that distinguish the different CHIR were used to further categorize the different CHIR. For this purpose we employed the criteria for CHIR differentiation as outlined in Table 2. Out of the total 130 CHIR genes, 84 were categorized as functional genes and 46 as pseudogenes.

CHIR genes were previously annotated in the chicken genome sequence, but they have been deposited into the “chromosome unaligned” due to the fact, that they could not be assembled. Likewise the entire chromosome 31 information is missing in the chicken genome database. As expected, CHIR genes that have been

annotated in the ENSEMBL genebank have counterparts in the assembly presented here.

46 genes in the assembly were characterized as pseudogenes out of a single reason or a combination of different features, such as lack of a signal peptide, premature termination, frame shifts or further errors leading to infunctional genes (Table 3). For some of these genes that are located close to boundaries of contigs it cannot be excluded that upon further assembly they may in fact resemble functional genes.

We also analyzed the coverage of the contigs taking into account CHIR genes, pseudogenes, and repetitive elements (Table 4). Repetitive elements represented on average 21% of the sequence with a range between 10% and 95% depending on the individual con-

**Table 3**  
CHIR pseudogenes.

Type	Number	Stop in exon	Frame shift	Lack of exon	Lack of signal peptide
CHIRAp	25	13	12	7	
CHIRBp	5	4	1	2	
CHIRAB1p	2	2			
CHIRAB3p	5	5	1	1	1
CHIRp <sup>a</sup>	9	4	2	19	

<sup>a</sup> Unreliable to a certain CHIR type due to big deletions.

tigs. The coverage of the contigs with CHIR genes and pseudogenes was very variable with some contigs lacking any of those. On average 18% and 8% of the total sequence represented CHIR genes and pseudogenes, respectively.

### 3.3. Comparative analysis of CHIR

As a next step of the analysis the functional CHIR found in the contigs were all translated into proteins and compared to each other. We also included the previously identified 62 functional CHIR from LSL chickens (Fig. 2) (Laun et al., 2006). Comparing the entire proteins including the extracellular and cytoplasmic domains revealed that most of the bifunctional CHIRAB receptors formed a separate cluster (Fig. 2, indicated with CHIRAB). In addition, there was a large clade containing CHIRA sequences only (Fig. 2, CHIRA). The rest of the sequences formed smaller roots where different CHIR types intermingled.

The comparison further revealed that there were six pairs of identical CHIR sequences, including a single RJF-LSL pair between two CHIRB sequences and five pairs of identical CHIR present within

the RJF sequences. The single RJF-LSL pair seems to be the only region that is overlapping between the two datasets, since intensive comparisons of all available LSL and RJF derived BAC sequences have not detected further sequence overlaps.

The identical CHIR pairs within the RJF BAC sequences were further analyzed. When the nucleotide sequences were compared, several highly identical (more than 95% identity) sequence pairs were identified between contigs that included exons, introns and intergenic regions (Fig. 1, different coloured boxes). Interestingly, in the vicinity of this homologous sequence pairs, there were clear differences concerning CHIR genes, pseudogenes or just intergenic regions. These homologous regions maybe therefore represent the result of recent genomic rearrangements and duplications.

In order to further analyze possible events that indicate the instability of the locus, we either compared the entire extracellular domain or the Ig domains of all CHIR (data not shown). In addition to the five RJF pairs, identical throughout the entire sequence, there was one additional pair that shared both Ig domains (CHIRB/6 in contig 7 and CHIRB/21 in contig 21). On the single Ig level, three pairs of shared Ig domains were detected, and one Ig domain was

**Table 4**  
Contig coverage including repetitive elements, CHIR genes and pseudogenes.<sup>a</sup>

Contigs	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
LINE <sup>b</sup>	83.3	–	6.4	5.64	8.1	5.2	4.53	5.6	2.4	5.3	5.7	8.3	4.1
LTR <sup>c</sup>	11.6	6.1	7.4	9.6	–	5.7	6.29	7.9	8.5	10.3	10.4	1.5	14.8
DNA-transposons	–	11.8	–	0.64	9.2	0.4	–	–	–	–	3.3	–	–
∑ Repetitive elements	94.9	18.0	13.7	15.88	17.4	11.3	11.26	13.5	10.9	15.6	19.4	9.8	18.9
∑ CHIR genes <sup>d</sup>	–	17.3	24.7	17.13	–	20.5	14.48	13.9	13.9	24.7	24.6	13.5	15.3
∑ CHIR pseudogenes <sup>d</sup>	–	12.2	2.5	5.9	13.9	4.1	9.12	8.5	12.7	3.5	–	–	7.7
Coverage	94.9	47.5	40.9	38.91	31.2	35.9	34.86	35.9	37.5	43.7	44.0	23.3	41.9

Contigs	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	Mean
LINE	52.1	7.4	5.3	–	3.0	6.0	10.7	3.9	12.5	4.6	8.0	2.8	2.2	
LTR	17.3	27.1	9.4	33.0	21.8	6.5	24.5	12.5	4.1	14.5	5.7	17.2	9.1	
DNA-transposons	–	1.1	0.5	–	–	1.0	–	1.1	1.2	–	1.9	–	4.4	
∑ Repetitive elements	69.4	35.6	15.3	33.0	24.8	13.5	35.1	17.5	17.8	19.0	15.7	20.0	15.6	20.9
∑ CHIR genes	–	9.9	21.2	–	14.2	15.3	–	16.5	23.9	5.7	21.6	15.0	15.9	18.1
∑ CHIR pseudogenes	–	9.9	3.9	13.4	4.0	7.1	18.4	5.4	5.3	9.1	2.7	4.4	8.2	7.9
Coverage	69.4	55.3	40.3	46.4	43.0	35.9	53.5	39.4	47.1	33.8	39.9	39.4	39.7	42.4

<sup>a</sup> Given as percentage of total sequence length.

<sup>b</sup> Including L2, CR1, and Rex.

<sup>c</sup> Including hobo-activator.

<sup>d</sup> Including exons and introns.

**Table 5**  
Comparison of genomic CHIR sequence analyses.

	Length (kbp)	Functional CHIR				Pseudogenes
		CHIRA <sup>a</sup>	CHIRB	CHIRAB	Total	
LSL BAC <sup>b</sup>	550	25 (24)	22 (21)	15 (15)	62 (60)	41 (40)
RJF BAC	1283	35 (27)	26 (20)	23 (18)	84 (65)	46 (35)
Total	1833	60 (26)	48 (21)	38 (16)	146 (63)	87 (37)

<sup>a</sup> Numbers in paranthesis represent percentage of total CHIR.

<sup>b</sup> Laun et al. (2006).

found within three CHIR. Interestingly, the Ig domains were only identical within one type of receptor (e.g. one Ig domain shared between two CHIRB), but not between different CHIR types.

#### 4. Discussion

The chicken genome project has substantially improved our knowledge regarding genes and gene structures (Hillier et al., 2004). Together with other projects such as the generation of EST databases, it is now feasible in most instances to identify genes and gene families within the genome that previously remained uncharacterized, due to the low overall sequence homology between mammals and birds (Burt and White, 2007). The annotation process of the chicken genome project seems to be successful for most of the chromosomes; however, some areas such as the entire microchromosome 31 have not been annotated yet. The inability to assemble and annotate certain chromosomal regions reflects the special features within these areas. In the case of microchromosome 31 we have shown before by fluorescence in situ hybridization, that it harbours the chicken LRC (Viertlboeck et al., 2005). The intensity of the fluorescence signal on the microchromosome 31 with a single, short CHIR probe was unexpectedly strong, indicative of multiple genes hybridizing with this probe. Further analyses have substantiated this finding and it is now clear that the CHIR family consists of many genes and pseudogenes that are highly diversified (Laun et al., 2006; Viertlboeck et al., 2005, 2009). These features of a diverse gene family with many polymorphic members that share a high degree of sequence identity are a serious obstacle for the assembly and annotation process. In a first attempt to overcome this drawback, Laun et al. (2006) have used a LSL chicken derived BAC library and generated out of seven BAC sequences four stretches of 550 kbp, containing more than 100 CHIR. The analyses presented here were initiated to further improve the annotation of the CHIR locus. For this reason, we decided to take advantage of the already accessible sequence information of the RJF genome project, since this will be most likely the first genome to be entirely completed in the future. Moreover, given that the CHIR represent a highly diverse, polymorphic family, it is important to concentrate on sequences derived from a single inbred animal.

The assembly presented here consists of 26 contigs that contain 130 CHIR genes, including pseudogenes. Although the present RJF assembly and the previous LSL assembly seem to overlap at best at one position, the comparison of the findings of both sequence analyses is rewarding (Table 5). In both cases the most numerous receptor type is the activating CHIRA, followed by the inhibitory CHIRB and the bifunctional CHIRAB. In addition, the percentage of pseudogenes is similar in both cases. In light of the putative phylogeny of CHIR (Laun et al., 2006) were CHIRB represent the ancestral form that has then adapted to CHIRAB by the acquisition of a charged transmembrane region and finally to CHIRA by a point mutation, this finding underscores an evolutionary advantage of activating versus inhibitory receptors, especially if bifunctional receptors are also added to the potentially activating receptor type. The large number of pseudogenes may reflect a consequence of the genomic instability that causes frequent alterations of genes.

The 30 chicken microchromosomes resemble roughly 23% of the entire chromosome, but they may contain up to 50% of the genes (Habermann et al., 2001). The length of individual microchromosomes has not been precisely determined. It is tempting to speculate that the entire microchromosome 31 only contains the CHIR locus. This unique situation may explain the extraordinary genomic instability present in the CHIR locus, which seems to be beneficial for CHIR genes but most certainly would be harmful for most other genes. As an example for selection acting on a receptor causing effects on unrelated genes that are linked on the same

chromosomal area, it has been hypothesized that selection pressure on the Fc $\alpha$ R (CD89) has caused deletion of the KIR locus in mice (Parham, 2008). Thus by reserving an entire microchromosome for one large receptor family, there would not be any negative side effects for other genes. It is of note that in the chicken other immunoregulatory Ig-like receptor families are not as expanded as CHIR, but contain equal receptor numbers than their mammalian counterparts. These families including CD200, CD300 TREM and SIRP are all located to different chromosomes (Viertlboeck et al., 2006, 2008). The reason for this extraordinarily high number and diversity of CHIR has not been resolved. It can only be speculated by their homology to mammalian counterparts and their expression on various types of leukocytes that CHIR represent a major detection system for pathogens, and that constant evolution forced by pathogens shapes the CHIR repertoire. The completion of the entire genomic locus and the identification of CHIR ligands will be an essential step to further characterize CHIR complexity and function.

#### Acknowledgements

We like to thank Dr. Wesley Warren, Research Assistant Professor, Washington University, St. Louis, School of Medicine, Department of Genetics for providing the BAC sequences. These studies were supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant GO489/3-6 (to T.W.G.).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molimm.2010.05.001.

#### References

- Arnon, T.I., Kaiser, J.T., West Jr., A.P., Olson, R., Diskin, R., Viertlboeck, B.C., Gobel, T.W., Bjorkman, P.J., 2008. The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 381, 1012–1024.
- Burge, C., Karlin, S., 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* 268, 78–94.
- Burt, D.W., White, S.J., 2007. Avian genomics in the 21st century. *Cytogenet. Genome Res.* 117, 6–13.
- Gusel'nikov, S.V., Reshetnikova, E.S., Najakshin, A.M., Mechetina, L.V., Robert, J., Taranin, A.V., 2010. The amphibians *Xenopus laevis* and *Silurana tropicalis* possess a family of activating KIR-related immunoglobulin-like receptors. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 308–315.
- Habermann, F.A., Cremer, M., Walter, J., Kreth, G., von Hase, J., Bauer, K., Wienberg, J., Cremer, C., Cremer, T., Solovei, I., 2001. Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. *Chromosome Res.* 9, 569–584.
- Hammond, J.A., Guethlein, L.A., Abi-Rached, L., Moesta, A.K., Parham, P., 2009. Evolution and survival of marine carnivores did not require a diversity of killer cell Ig-like receptors or Ly49 NK cell receptors. *J. Immunol.* 182, 3618–3627.
- Hillier, L.W., Miller, W., Birney, E., Warren, W., Hardison, R.C., Ponting, C.P., Bork, P., Burt, D.W., Groenen, M.A., Delany, M.E., Dodgson, J.B., Fingerhut, S., Assemblly, G., Chinwalla, A.T., Clifton, P.F., Clifton, S.W., Delehaunty, K.D., Fronick, C., Fulton, R.S., Graves, T.A., Kremetzki, C., Layman, D., Magrini, V., McPherson, J.D., Miner, T.L., Minx, P., Nash, W.E., Nhan, M.N., Nelson, J.O., Oddy, L.G., Pohl, C.S., Randall-Maher, J., Smith, S.M., Wallis, J.W., Yang, S.P., Romanov, M.N., Rondelli, C.M., Paton, B., Smith, J., Morrice, D., Daniels, L., Tempest, H.G., Robertson, L., Masabanda, J.S., Griffin, D.K., Vignal, A., Fillon, V., Jacobsson, L., Kerje, S., Andersson, L., Crooijmans, R.P., Aerts, J., van der Poel, J.J., Ellegren, H., Sequencing, C., Caldwell, R.B., Hubbard, S.J., Grafham, D.V., Kierzek, A.M., McLaren, S.R., Overton, I.M., Arakawa, H., Beattie, K.J., Bezzubov, Y., Boardman, P.E., Bonfield, J.K., Croning, M.D., Davies, R.M., Francis, M.D., Humphray, S.J., Scott, C.E., Taylor, R.G., Tickle, C., Brown, W.R., Rogers, J., Buerstedde, J.M., Wilson, S.A., Sequencing, Libraries, O., Stubbs, L., Ovcharenko, I., Gordon, L., Lucas, S., Miller, M.M., Inoko, H., Shiina, T., Kaufman, J., Salomonsen, J., Skjoed, K., Wong, G.K., Wang, J., Liu, B., Yu, J., Yang, H., Nefedov, M., Koriabine, M., Dejong, P.J., Annotation, A., Goodstadt, L., Webber, C., et al., 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432, 695–716.
- Kelley, J., Walter, L., Trowsdale, J., 2005. Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet.* 1, 129–139.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 9, 299–306.

- Laun, K., Coggill, P., Palmer, S., Sims, S., Ning, Z., Ragoussis, J., Volpi, E., Wilson, N., Beck, S., Ziegler, A., Volz, A., 2006. The leukocyte receptor complex in chicken is characterized by massive expansion and diversification of immunoglobulin-like Loci. *PLoS Genet.* 2, e73.
- Martin, A.M., Kulski, J.K., Witt, C., Pontarotti, P., Christiansen, F.T., 2002. Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men. *Trends Immunol.* 23, 81–88.
- Parham, P., 2008. The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. *Semin. Immunol.* 20, 311–316.
- Ponting, C.P., Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., 1999. SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 229–232.
- Purzel, J., Schmitt, R., Viertlboeck, B.C., Gobel, T.W., 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.
- Rogers, S.L., Viertlboeck, B.C., Gobel, T.W., Kaufman, J., 2008. Avian NK activities, cells and receptors. *Semin. Immunol.* 20, 353–360.
- Stafford, J.L., Bengten, E., Du Pasquier, L., Miller, N.W., Wilson, M., 2007. Channel catfish leukocyte immune-type receptors contain a putative MHC class I binding site. *Immunogenetics* 59, 77–91.
- Viertlboeck, B.C., Croijmans, R.P., Groenen, M.A., Gobel, T.W., 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.
- Viertlboeck, B.C., Habermann, F.A., Schmitt, R., Groenen, M.A., Du Pasquier, L., Gobel, T.W., 2005. The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *J. Immunol.* 175, 385–393.
- Viertlboeck, B.C., Hanczaruk, M.A., Schmitt, F.C., Schmitt, R., Gobel, T.W., 2008. Characterization of the chicken CD200 receptor family. *Mol. Immunol.* 45, 2097–2105.
- Viertlboeck, B.C., Schmitt, R., Gobel, T.W., 2006. The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L. *Immunogenetics* 58, 180–190.
- Viertlboeck, B.C., Schweinsberg, S., Hanczaruk, M.A., Schmitt, R., Du Pasquier, L., Herberg, F.W., Gobel, T.W., 2007. The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11718–11723.
- Viertlboeck, B.C., Schweinsberg, S., Schmitt, R., Herberg, F.W., Gobel, T.W., 2009. The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors. *J. Immunol.* 182, 6985–6992.
- Volz, A., Wende, H., Laun, K., Ziegler, A., 2001. Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex. *Immunol. Rev.* 181, 39–51.
- Yoder, J.A., 2009. Form, function and phylogenetics of NITRs in bony fish. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 135–144.
- Yoder, J.A., Mueller, M.G., Wei, S., Corliss, B.C., Prather, D.M., Willis, T., Litman, R.T., Djeu, J.Y., Litman, G.W., 2001. Immune-type receptor genes in zebrafish share genetic and functional properties with genes encoded by the mammalian leukocyte receptor cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6771–6776.
- 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.

## 4 Diskussion

Das Hühnergenom-Sequenzierungsprojekt und die Erstellung der Wageningen Hühner-BAC-Bibliothek sind wichtige Schritte, um die genomische Organisation der einzelnen Chromosomen und die Genstrukturen des Huhns zu erfassen.

Bei der Untersuchung der Chromosomen des Huhns wurde festgestellt, dass die 33 Mikrochromosomen ca. ein Drittel der genomischen DNA darstellen. Sie sind aber so genreich, dass sie vermutlich doppelt so viele Gene beinhalten wie die sechs Makrochromosomen [1]. Allerdings konnten noch nicht alle Bereiche annotiert werden, so wie beispielsweise das Mikrochromosom 31. Mithilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass sowohl der LRC Marker ROSO264 [53] als auch eine CHIR-DNA Probe auf Mikrochromosom 31 hybridisieren. Das verdeutlichte, dass dieses Mikrochromosom den LRC des Huhns beinhaltet und aufgrund des starken Signals hier viele CHIR zu finden sind [14].

Erstmals wurde 2006 versucht, anhand der BAC-Bibliothek aus dem Genom des LSL-Huhns die Sequenzstücke und Gene des Hühner-LRC zu ordnen. Dabei fanden Laun et al. in sieben BAC-Klonen, welche insgesamt 550kb umfassen, über 100 CHIR [15]. Um die bessere Erfassung dieses Genortes und seiner Bedeutung voranzutreiben, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die entsprechenden BAC-Sequenzen des Genoms eines einzelnen ingezüchteten RJF zu ordnen, um die Sequenzen und die Gene des LRC dieses Tieres näher zu untersuchen. Das Problem ist, dass die acht zur Verfügung stehenden BAC-Klone aus bis zu 21 ungeordneten Stücken bestehen. Trotz Verlängerung dieser Teilsequenzen mit Hilfe der Trace Archive Datenbank des National Center for Biotechnology Information und zusätzlichen Sequenzstücken des Washington University Genome Center, konnte keine durchgehende Sequenz erstellt werden. Bisherige Untersuchungen ergaben, dass die Mitglieder der CHIR-Genfamilie sehr zahlreich und verschiedenartig, aber auch in vielen Sequenzabschnitten identisch sind [14,15]. Diese Tatsache trägt entscheidend zu dem Problem bei die Sequenzstücke einander zuzuordnen und die Annotation der Gene in diesem Bereich vorzunehmen.

Ebenso wie im LSL-Huhn [15] konnten im Genom des RJF in 875kb über 100 CHIR identifiziert werden. Vergleicht man diese mit den homologen Regionen anderer Wirbeltiere, dann fällt beim Huhn die große Anzahl an verschiedenartigen Mitgliedern dieser IgSF auf. So beinhaltet z.B. der LRC des Menschen, der 1Mb umfasst, nur 30

Gene der IgSF [4] und in marinen Fleischfressern (Robben und Seelöwen) findet man sogar nur einen einzigen, schwach polymorphen KIR [59].

Als Liganden für ILT und KIR im menschlichen LRC wurden humane-Leukozytenantigen (HLA) –Klasse I-Moleküle identifiziert. Die Familien interagieren allerdings mit unterschiedlichen Epitopen des HLA-Klasse I-Molekül. So binden die Mitglieder der KIR an die hochpolymorphen  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen, wobei die Entstehung verschiedenartiger, polymorpher KIR wahrscheinlich von Vorteil ist um diese Bindung zu optimieren. Dagegen gehen ILT eine Bindung mit der höher konservierten  $\alpha 3$ -Domäne des HLA-Proteins ein, was ein Grund dafür sein könnte, dass bei diesen Rezeptoren weniger Polymorphismus festzustellen ist [4].

Warum die Vielfalt der CHIR so groß ist, ist noch nicht bekannt und hängt auch mit dem bis jetzt spärlichen Wissen über ihre Liganden zusammen. Sogar innerhalb einer Rezeptorsubgruppe wie den CHIRAB1 bindet nur ein Teil an IgY, die sogenannten CHIR-AB1-ähnlichen Rezeptoren. Andere CHIRAB1 weisen durch die Varianz nur weniger AS keine IgY-Bindung auf und haben evtl. andere Liganden [60]. Trotz der großen Ähnlichkeit der einzelnen CHIRAB1-Proteinsequenzen des RJF, die phylogenetisch sehr nah beieinander liegen, sind die Unterschiede von einzelnen AS so entscheidend, dass von 14 identifizierten CHIRAB1 nur acht Rezeptoren potenziell IgY binden können (siehe Abb. 2-2).

Weiter fällt auf, dass es sich bei allen erfassten Genen in diesem Bereich ausschließlich um CHIR handelt. Eine Erklärung hierfür könnte die enorme genomische Instabilität an diesem Genort sein. Diese stellt für die CHIR scheinbar einen Vorteil dar, wird aber für die meisten anderer Gene eher von großem Nachteil sein. Aufgrund einer solchen Instabilität können unabhängige Gene, die sich auf dem gleichen chromosomalen Abschnitt befinden, mit beeinflusst werden. So wird z.B. vermutet, dass der Selektionsdruck auf den Fc $\alpha$ R der Maus auch eine Deletion des benachbarten KIR Locus verursacht hat [61].

In 875kb, die sich in 26 Contigs aufteilen, wurden insgesamt 130 CHIR Gene gefunden und 46 von ihnen meist aufgrund mehrerer Eigenschaften als Pseudogene identifiziert, wie fehlende Exons, Leserahmenverschiebung und zu frühe Stoppcodons. Allerdings liegen einiger dieser Pseudogene nah an Contigenden und könnten nach Ergänzung durch neue Sequenzstücke durchaus funktionsfähige Gene repräsentieren. Von den 84 funktionsfähigen Genen kodieren 35 für aktivierende Rezeptoren. Frühere Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass der



ursprüngliche Vorläufer der CHIR hemmende Funktion hatte [15]. Umso bedeutender ist wohl die Tatsache, dass heute mehr aktivierende als hemmende Rezeptoren kodiert werden. Hinzu kommt, dass die 23 bifunktionalen CHIR potentiell aktivierend sind, wie für KIR2DL4 gezeigt wurde [8]. Dies bedeutet wohl, dass mit der Entwicklung aktivierender Rezeptoren ein evolutionärer Vorteil einhergeht [15].

Beim Vergleich der Proteinsequenzen der CHIR des RJF mit denen des LSL-Huhns, konnte nur ein einziges identisches Paar identifiziert werden. Auch bei Vergleichen der BAC-Sequenzen der beiden Hühnerrassen fielen keine weiteren Ähnlichkeiten auf. Dies kann ein Indiz für eine extrem hohe genomische Varianz dieses Genortes sein. Oder die Region, über die sich die CHIR Gene erstrecken, ist so groß, dass die von Laun et al. und die in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen sich nicht überschneiden.

Innerhalb der CHIR wurden fünf identische Rezeptoren gefunden. Ein Paar hemmende und jeweils zwei Paare aktivierende und bifunktionale Rezeptoren, wobei die entsprechenden Bereiche der BAC-Sequenzen und die sich darauf befindenden Gene oft sehr ähnlich sind, aber nicht auf dem gleichen Contig liegen. Untersucht man die einzelnen Ig-Domänen der CHIR des RJF, so fällt auf, dass es nur identische Übereinstimmungen bei gleichen Rezeptortypen gibt. Bei der Erstellung eines phylogenetischen Baums mit den kompletten Proteinsequenzen aller CHIR des RJF und LSL ordnen sich fast alle CHIRAB auf einem Ast und es fällt ein anderer Bereich auf, der ausschließlich CHIRA beinhaltet. Die restlichen Proteinsequenzen der einzelnen Rezeptortypen (A, B, AB) bilden kleine Einheiten, die sich mit solchen anderer Typen auf gleiche Äste ordnen.

Die CHIR Genfamilie zeichnet sich aus durch eine einheitliche molekulare Architektur kombiniert mit einer großen Vielfalt an extrazellulären Ig-Domänen und zytoplasmatischen Anteilen. Sie bilden eine einzigartige Multigenfamilie mit neuen Rezeptortypen, die in Säugetieren so nicht identifiziert wurden [14]. Der Nachweis von zwei CHIR als entfernte Verwandte von murinen PIR und menschlichen ILT [55] spricht allerdings für einen gemeinsamen Vorfahren, der wahrscheinlich aus der Zeit vor der Trennung von Vögeln und Säugern stammt [4].

Die Vervollständigung des gesamten LRC des Huhns und die Identifizierung der Liganden der CHIR wird uns dem Verständnis der Komplexität dieses Genortes und der Bedeutung der hier kodierten Proteine für die Immunantwort näher bringen.

## 5 Zusammenfassung

### Der Leukozyten Rezeptor Komplex des Bankivahuhns

Der Leukozyten Rezeptor Komplex (LRC) des Bankivahuhns (RJF) auf Chromosom 31 ist seit der Verfügbarkeit der genomischen Sequenzen noch nicht näher untersucht worden. Diese Studie trägt durch die Ordnung der vorhandenen Sequenzfragmente und Annotierung der darauf befindlichen Gene dazu bei, den Genort zu charakterisieren. Für die Analyse des LRC des RJF stehen acht artifizielle Chromosomen (BAC) -Klone zur Verfügung, die aber nicht vollständige Sequenzfolgen darstellen sondern aus insgesamt 102 einzelnen, ungeordneten Stücken bestehen und ca. 1,3 Mb umfassen. Mithilfe öffentlicher Datenbanken und neu bereitgestellten Daten konnten diese Einzelsequenzen um insgesamt ca. 65 kb verlängert werden. Schließlich wurden die Stücke mithilfe eines Computerprogramms geordnet und individuell überprüft. So entstanden 26 überlappende Fragmente, wobei für vier Sequenzstücke keine Überschneidungen gefunden wurden. Die so entstandene Gesamtsequenz von ca. 875 kb wurde nun auf das Vorhandensein von Gene untersucht. Es wurden auf diesem genomischen Abschnitt 130 Hühner Immunglobulin-ähnliche Rezeptor (CHIR) -Gene gefunden, wovon 46 Pseudogene darstellen. Die 84 funktionsfähigen Gene teilen sich auf in 35 für aktivierende (CHIRA), 26 für hemmende (CHIRB) und 23 für bifunktionale (CHIRAB) Rezeptoren. In der Subgruppe der 14 CHIRAB1 ist bei acht Rezeptoren eine IgY-Bindung wahrscheinlich, da sie entsprechende Sequenzmerkmale aufweisen. Beim Vergleich der kompletten Proteinsequenzen findet man fünf identische Paare, ein Paar CHIRB und jeweils zwei Paare CHIRA und CHIRAB. Aus dem phylogenetischen Vergleich der Proteinsequenzen der CHIR des RJF und des Lohmann Leghorn ergibt sich lediglich die identische Übereinstimmung eines CHIRB. Durchschnittlich machen repetitive Elemente 21%, die CHIR Gene und Pseudogene 18% der Sequenzen aus.

## 6 Summary

### **The Leukocyte Receptor Complex of the Red Jungle Fowl**

Although the genomic sequences are available, the leukocyte receptor complex (LRC) of the Red Jungle Fowl (RJF) had not been investigated in more detail. This study contributes to the characterization of the chicken immunoglobulin-like receptor (CHIR) genelocus by assembling the published sequence fragments and annotating the genes. For the analysis of the LRC of the RJF there are eight bacterial artificial chromosome (BAC) clones available. They do not represent an entire sequence, but consist of 102 single, unordered pieces and span about 1,3 Mb. Through search in public databases and novel, recently provided sequence data these single sequences could be further elongated with another 65 kb. Finally the fragments were assembled with an alignment program and validated manually. 26 contigs could be assembled while four pieces did not overlap and remained as single sequences. In a next step the resulting sequence of about 875 kb was examined for encoded genes. 130 CHIR genes were presented throughout the entire sequences, including 46 pseudogenes. The 84 functional genes can be differentiated into 35 activating (CHIRA), 26 inhibitory (CHIRB) and 23 bifunctional (CHIRAB) receptors. From a subgroup of 14 CHIRAB1 eight potentially bind to chicken IgY due to conserved sequence motifs. By comparing the entire protein sequences five identical pairs have been found, one pair of CHIRB and two pairs of CHIRA and CHIRAB. Building a phylogenetic tree with protein of CHIR from RJF and LSL revealed just one identical counterpart of CHIRB. Repetitive elements represented on average 21%, CHIR genes and pseudogenes 18% of the total sequence.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Trowsdale, J., et al., *The genomic context of natural killer receptor extended gene families*. Immunological Reviews, 2001. **181**: p. 20-38.
2. Renedo, M., et al., *The human natural killer gene complex is located on chromosome 12p12-p13*. Immunogenetics, 1997. **46**(4): p. 307-311.
3. Wende, H., et al., *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4*. Mammalian Genome, 1999. **10**: p. 154-160.
4. Martin, A.M., et al., *Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men*. Trends in Immunology, 2002. **23**: p. 81-88.
5. Barrow, A.D. and J. Trowsdale, *The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 98-123.
6. Gray-Owen, S.D. and R.S. Blumberg, *CEACAM1: contact-dependent control of immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 433-446.
7. Kuespert, K., S. Pils, and C.R. Hauck, *CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(5): p. 565-571.
8. Crocker, P.R. and S. Gordon, *Properties and distribution of a lectin-like hemagglutinin differentially expressed by murine stromal tissue macrophages*. J Exp Med, 1986. **164**(6): p. 1862-1875.
9. Stamenkovic, I. and B. Seed, *The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion*. Nature, 1990. **345**(6270): p. 74-77.
10. 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.
11. Litman, G.W., N.A. Hawke, and J.A. Yoder, *Novel immune-type receptor genes*. Immunological Reviews, 2001. **181**: p. 250-259.
12. Yoder, J.A., *Form, function and phylogenetics of NITRs in bony fish*. Developmental and Comparative Immunology, 2009. **33**(2): p. 135-144.
13. Zucchetti, I., et al., *Origin and evolution of the vertebrate leukocyte receptors: the lesson from tunicates*. Immunogenetics, 2009. **61**(6): p. 463-481.
14. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types*. Journal of Immunology, 2005. **175**: p. 385-393.
15. Laun, K., et al., *The leukocyte receptor complex in chicken is characterized by massive expansion and diversification of immunoglobulin-like Loci*. PLoS Genet, 2006. **2**: p. e73.
16. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annual Review in Immunology, 2002. **20**: p. 217-251.
17. Wende, H., A. Volz, and A. Ziegler, *Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster*. Immunogenetics, 2000. **51**: p. 703-713.
18. Biassoni, R., et al., *Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure*. Journal of cellular and molecular medicine, 2003. **7**: p. 376-387.
19. Brown, D., J. Trowsdale, and R. Allen, *The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease*. Tissue Antigens, 2004. **64**: p. 215-225.
20. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. Annual Review in Immunology, 1988. **6**: p. 381-405.

21. Smith, D.K. and H. Xue, *Sequence profiles of immunoglobulin and immunoglobulin-like domains*. J Mol Biol, 1997. **274**(4): p. 530-545.
22. Vivier, E., J.A. Nunes, and F. Vely, *Natural killer cell signaling pathways*. Science, 2004. **306**: p. 1517-1519.
23. Sawicki, M.W., et al., *Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 52-65.
24. Gergely, J., I. Pecht, and G. Sarmay, *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells*. Immunology Letters, 1999. **68**: p. 3-15.
25. Campbell, K.S. and M. Colonna, *Human natural killer cell receptors and signal transduction*. International Reviews in Immunology, 2001. **20**: p. 333-370.
26. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**: p. 84-89.
27. Viertböck, B., *Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung neuer "Chicken Ig-like" Rezeptoren*. 2004, LMU: München.
28. Volz, A., et al., *Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex*. Immunological Reviews, 2001. **181**: p. 39-51.
29. Cao, W., et al., *Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1399-1405.
30. Bellon, T., et al., *Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor*. Journal of Immunology, 2002. **168**: p. 3351-3359.
31. Sayos, J., et al., *Recruitment of C-terminal Src kinase by the leukocyte inhibitory receptor CD85j*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **324**(2): p. 640-647.
32. Nakajima, H., et al., *Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain*. Journal of Immunology, 1999. **162**: p. 5-8.
33. Young, N.T., et al., *Conserved organization of the ILT/LIR gene family within the polymorphic human leukocyte receptor complex*. Immunogenetics, 2001. **53**: p. 270-278.
34. Wilson, M.J., et al., *Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2000. **97**: p. 4778-4783.
35. Trowsdale, J., *Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes*. Immunity, 2001. **15**(3): p. 363-374.
36. Kikuchi-Maki, A., et al., *KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3415-3425.
37. Yusa, S. and K.S. Campbell, *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells*. Journal of Immunology, 2003. **170**: p. 4539-4547.
38. Long, E.O., *Regulation of immune responses through inhibitory receptors*. Annual Review in Immunology, 1999. **17**: p. 875-904.
39. Uhrberg, M., et al., *Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 753-763.
40. Clemetson, J.M., et al., *The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc alpha R and*

- the natural killer receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**: p. 29019-29024.
41. Meyaard, L., et al., *LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 283-290.
  42. van der Vuurst de Vries, A.R., et al., *Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor-1 (LAIR-1) is differentially expressed during human B cell differentiation and inhibits B cell receptor-mediated signaling*. Eur J Immunol, 1999. **29**(10): p. 3160-3167.
  43. Jandrot-Perrus, M., et al., *Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1798-1807.
  44. Lebbink, R.J., et al., *Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1*. Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**: p. 1419-1425.
  45. Lebbink, R.J., et al., *The mouse homologue of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 is an inhibitory receptor that recruits Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-2, but not SHP-1*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5535-5543.
  46. Kremer, E.J., et al., *The gene for the human IgA Fc receptor maps to 19q13.4*. Hum Genet, 1992. **89**(1): p. 107-108.
  47. Pfefferkorn, L.C. and G.R. Yeaman, *Association of IgA-Fc receptors (Fc alpha R) with Fc epsilon RI gamma 2 subunits in U937 cells. Aggregation induces the tyrosine phosphorylation of gamma 2*. J Immunol, 1994. **153**(7): p. 3228-3236.
  48. Patry, C., et al., *Identification of Fc alpha receptor (CD89) isoforms generated by alternative splicing that are differentially expressed between blood monocytes and alveolar macrophages*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4442-4448.
  49. Stewart, W.W. and M.A. Kerr, *The specificity of the human neutrophil IgA receptor (Fc alpha R) determined by measurement of chemiluminescence induced by serum or secretory IgA1 or IgA2*. Immunology, 1990. **71**(3): p. 328-334.
  50. Wines, B.D., et al., *Identification of residues in the first domain of human Fc alpha receptor essential for interaction with IgA*. Journal of Immunology, 1999. **162**: p. 2146-2153.
  51. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**: p. 953-960.
  52. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells*. Nature, 2001. **409**: p. 1055-1060.
  53. Smith, J., et al., *Comparative mapping of human Chromosome 19 with the chicken shows conserved synteny and gives an insight into chromosomal evolution*. Mammalian Genome, 2002. **13**: p. 310-315.
  54. Viertlboeck, B.C., et al., *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*. Journal of Immunology, 2004. **173**: p. 7385-7393.
  55. Dennis, G., Jr., H. Kubagawa, and M.D. Cooper, *Paired Ig-like receptor homologs in birds and mammals share a common ancestor with mammalian*

- Fc receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2000. **97**: p. 13245-13250.
56. Wu, J., et al., *An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10*. Science, 1999. **285**(5428): p. 730-732.
57. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors*. Journal of Immunology, 2009. **182**: p. 6985-6992.
58. Purzel, J., et al., *Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc(alpha)RI interaction*. Journal of Immunology, 2009. **183**: p. 4554-4559.
59. Hammond, J.A., et al., *Evolution and survival of marine carnivores did not require a diversity of killer cell Ig-like receptors or Ly49 NK cell receptors*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3618-3627.
60. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2007. **104**: p. 11718-11723.
61. Parham, P., *The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity*. Seminars in Immunology, 2008. **20**: p. 311-316.

## 8 Persönliche Daten

Name: Katharina Marianne Kerimeh Lochner  
Geburtsdatum: 13.05.1982  
Geburtsort: Peißenberg



## **Danksagung**

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. T. Göbel für die Überlassung des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung. Seine Hilfestellungen und Anregungen waren für mich von unschätzbarem Wert.

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

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für den freundschaftlichen Umgang und die schöne Zeit, ganz besonders auch Ramona Schmitt für die gute Einarbeitung im Labor und Birgit Viertlböck, die mir immer für computertechnische Fragen zur Verfügung stand.

Für ihre Freundschaft, lebhaftes Diskussionsverhalten, viel Lachen und Kritik an der richtigen Stelle bedanke ich mich bei Jana Pürzel.

Den anderen Doktoranden danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, aus der so manche private Freundschaft entstanden ist.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für den freundlichen Umgang und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung während des Studiums.

Besonderer Dank gilt meinen Geschwistern und meiner Mutter, deren Loyalität und seelischer Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Markus Gietl, der mir seit vielen Jahren zur Seite steht und trotz knapper Freizeit immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte. Seine Freundschaft, Hilfe, Ratschläge und konstruktive Kritik waren für mich besonders wertvoll.