

Aus dem  
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät München  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

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

Titel der Arbeit  
„Polymorphismus der Chicken Ig-like Receptors (CHIRs)“

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

von  
**Claudia Martina Gick**  
aus München  
München 2008

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

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| Dekan:            | Univ.-Prof. Dr. Braun   |
| Berichterstatter: | Univ.-Prof. Dr. Göbel   |
| Korreferent/en:   | Univ.-Prof. Dr. Förster |

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

*Charakter:*

*neben dem Geist wohl der einzige Luxus, den man bis heute nicht kaufen kann.*

Peter Rudl, deutscher Aphoristiker

Die in dieser Arbeit identifizierten 180 verschiedenen Nukleotidsequenzen wurden in der „EMBL Nucleotide Sequence Database“ unter den Zutrittsnummern (accession numbers) „FM200227“ bis „FM200406“ veröffentlicht.

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Einleitung.....   | 1  |
| 2.     | Literaturübersicht.....   | 2  |
| 2.1.   | Definitionen .....  | 2  |
| 2.1.1. | Domäne.....   | 2  |
| 2.1.2. | Immunglobulindomäne.....  | 2  |
| 2.1.3. | Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF) .....  | 3  |
| 2.2.   | Leukozyten-Rezeptor-Complex (LRC).....  | 3  |
| 2.2.1. | Nomenklaturuneinigkeit: Leukozyten-Rezeptor-Complex<br>oder Leukozyten-Rezeptor-Cluster ..... | 3  |
| 2.2.2. | Allgemeines.....  | 4  |
| 2.2.3. | Rezeptortypen des LRC.....  | 4  |
| 2.2.4. | Aufbau des LRC.....   | 5  |
| 2.2.5. | Exon-Intron-Struktur.....   | 7  |
| 2.2.6. | Mitglieder des LRC.....   | 8  |
| 3.     | Zielsetzung der Arbeit.....   | 16 |
| 4.     | Material und Methoden.....  | 17 |
| 4.1.   | Tiere und Tierhaltung .....   | 17 |
| 4.2.   | Präparation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus dem Blut.....                      | 17 |
| 4.2.1. | Material.....   | 17 |
| 4.2.2. | Durchführung .....  | 18 |
| 4.3.   | RNA-Präparation.....  | 18 |
| 4.3.1. | Material.....   | 18 |
| 4.3.2. | Durchführung .....  | 19 |
| 4.4.   | cDNA-Synthese.....  | 20 |
| 4.5.   | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....  | 20 |
| 4.5.1. | Herculase-PCR .....   | 21 |
| 4.5.2. | Hot-FIRE-Polymerase (HFP)-PCR .....   | 22 |
| 4.6.   | Agarosegelelektrophorese .....  | 24 |
| 4.6.1. | Material.....   | 24 |
| 4.6.2. | Durchführung .....  | 25 |
| 4.7.   | Gelaufreinigung.....  | 26 |
| 4.7.1. | Material.....   | 26 |
| 4.7.2. | Durchführung .....  | 26 |
| 4.8.   | Restriktionsenzymverdau.....  | 27 |
| 4.8.1. | Material.....   | 27 |
| 4.8.2. | Durchführung .....  | 27 |
| 4.9.   | SAP-Verdau .....  | 28 |
| 4.9.1. | Material.....   | 28 |
| 4.9.2. | Durchführung .....  | 28 |
| 4.10.  | TA-Klonierung .....   | 28 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.10.1. | Material.....   | 29 |
| 4.10.2. | Durchführung .....  | 29 |
| 4.11.   | Ligation.....   | 30 |
| 4.11.1. | Material.....   | 31 |
| 4.11.2. | Durchführung .....  | 31 |
| 4.12.   | Transformation von chemokompetenten TOP10 E. coli .....   | 31 |
| 4.12.1. | Material.....   | 31 |
| 4.12.2. | Durchführung .....  | 31 |
| 4.13.   | Plasmidaufreinigung.....  | 32 |
| 4.13.1. | Mini-Prep.....  | 32 |
| 4.13.2. | MidiPrep .....  | 33 |
| 4.14.   | Anlegen von Bakterienstocks.....  | 34 |
| 4.14.1. | Material.....   | 34 |
| 4.14.2. | Durchführung .....  | 34 |
| 4.15.   | DNA-Sequenzierung .....   | 34 |
| 4.16.   | Transfektion von eukaryotischen Zellen.....   | 35 |
| 4.16.1. | Transiente Transfektion von 293T-Zellen .....   | 35 |
| 4.16.2. | Stabile Transfektion von BWZ.36-Zellen .....  | 36 |
| 4.17.   | $\beta$ -Galactosidase-Assay mit BWZ.36-Zellen .....  | 37 |
| 4.17.1. | Material.....   | 38 |
| 4.17.2. | Durchführung .....  | 39 |
| 4.18.   | Kultivierung von Zellen.....  | 40 |
| 4.18.1. | Material.....   | 40 |
| 4.18.2. | Zelllinien .....  | 41 |
| 4.18.3. | Auftauen von Zellen .....   | 41 |
| 4.18.4. | Passagieren von Zellen.....   | 41 |
| 4.18.5. | Einfrieren von Zellen .....   | 42 |
| 4.19.   | Durchflusszytometrie.....   | 42 |
| 4.19.1. | Material.....   | 42 |
| 4.19.2. | Durchführung .....  | 43 |
| 4.20.   | Computerprogramme .....   | 44 |
| 4.20.1. | DNASTAR Lasergene Software.....   | 44 |
| 4.20.2. | MEGA4.....  | 44 |
| 5.      | Ergebnisse.....   | 45 |
| 5.1.    | Primer.....   | 45 |
| 5.1.1.  | Design eines geeigneten Primerpaars für die Klonierung von CHIRs mit 2 Ig-Domänen ...                                 | 45 |
| 5.1.2.  | Design eines geeigneten Primerpaars für die direkte Klonierung von<br>CHIRs mit 2 Ig-Domänen in den Zeta-Vektor ..... | 49 |
| 5.2.    | Erweiterung der Nomenklatur für CHIRs mit 2 Ig-Domänen.....   | 49 |
| 5.3.    | Ergebnisse der Untersuchungen am Huhn der Linie M11 .....   | 50 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 5.3.1. | Identifizierung von 142 Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen in PBMCs .....  | 50 |
| 5.3.2. | Untersuchung der 142 Sequenzen auf Proteinebene:<br>98 Unterschiedliche und 58 Identische in 14 Gruppen .....  | 53 |
| 5.3.3. | Definition „Unterschiedliche“, „Identische“, „Repräsentant“ .....  | 57 |
| 5.3.4. | Untersuchung der 142 Sequenzen auf Nukleotidebene:<br>103 Unterschiedliche, 52 Identische in 13 Gruppen .....  | 57 |
| 5.3.5. | Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung auf Proteinebene und der Untersuchung auf<br>Nukleotidebene: 5 Unterschiedliche zusätzlich auf Nukleotidebene .....  | 59 |
| 5.3.6. | Untersuchung der 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen:<br>74 Unterschiedliche, 35 Identische in 11 Gruppen .....   | 62 |
| 5.3.7. | Untersuchung der 98 Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen:<br>81 Unterschiedliche, 27 Identische in 10 Gruppen .....   | 63 |
| 5.4.   | Ergebnisse der Untersuchungen am Huhn der Linie R11 .....  | 64 |
| 5.4.1. | Identifizierung von 117 Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen in PBMCs .....  | 64 |
| 5.4.2. | Untersuchung der 117 Sequenzen auf Proteinebene:<br>71 Unterschiedliche, 63 Identische in 17 Gruppen .....   | 65 |
| 5.4.3. | Untersuchung der 117 Sequenzen auf Nukleotidebene:<br>77 Unterschiedliche, 54 Identische in 14 Gruppen .....   | 66 |
| 5.4.4. | Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung auf Proteinebene mit der Untersuchung auf<br>Nukleotidebene: 6 Unterschiedliche zusätzlich auf Nukleotidebene .....  | 68 |
| 5.4.5. | Untersuchung der 71 Ig1-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen:<br>48 Unterschiedliche, 31 Identische in 8 Gruppen .....  | 69 |
| 5.4.6. | Untersuchung der 71 Ig2-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen:<br>51 Unterschiedliche, 31 Identische in 11 Gruppen .....   | 70 |
| 5.5.   | Vergleich der Daten von M11 mit den Daten von R11 .....  | 71 |
| 5.5.1. | Vergleich der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11<br>mit den 71 unterschiedlichen von R11: 3 Identische .....  | 71 |
| 5.5.2. | Vergleich der 103 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen von M11<br>mit den 77 unterschiedlichen von R11: 2 Identische .....   | 73 |
| 5.5.3. | Vergleich der 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11<br>mit den 71 Ig1-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen von R11:<br>119 Unterschiedliche, 67 Identische in 17 Gruppen ..... | 74 |
| 5.5.4. | Vergleich der 98 Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11<br>mit den 71 Ig2-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen von R11:<br>127 Unterschiedliche, 64 Identische in 22 Gruppen ..... | 77 |
| 5.6.   | Ergebnisse der Untersuchungen am Huhn der Linie LSL .....  | 78 |
| 5.6.1. | Untersuchung der 51 Sequenzen auf Proteinebene: 50 Unterschiedliche, 1 Identische ....   | 79 |
| 5.6.2. | Untersuchung der 1 doppelten Sequenz auf Nukleotidebene:<br>auch auf Nukleotidebene identisch .....  | 79 |
| 5.6.3. | Untersuchung der 1 doppelten Sequenz auf Nukleotidebene in der gesamten Länge des<br>Rezeptors: 2 unterschiedliche Sequenzen .....   | 80 |

|   |   |        |
|---|---|--------|
| 5.7.  | Vergleich der Daten von M11 und R11 mit den Daten von LSL .....   | 82     |
| 5.7.1.  | Vergleich der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11 und der 71<br>unterschiedlichen von R11 mit den 50 unterschiedlichen von LSL: 1 Identischer zwischen<br>allen 3 Hühnerlinien, 2 Identische zwischen M11 und LSL ..... | 82     |
| 5.7.2.  | Vergleich der – auf Proteinebene zwischen M11 und LSL bzw. zwischen allen 3<br>Hühnerlinien - identischen Sequenzen auf Nukleotidebene .....  | 83     |
| 5.8.  | 23 CHIR-Konstrukte .....  | 83     |
| 5.8.1.  | Auswahl von 23 repräsentativen Sequenzen.....   | 83     |
| 5.8.2.  | Charakterisierung der 23 repräsentativen Sequenzen: 194 oder 195 Aminosäuren lang,<br>Identität zwischen 59,3 % und 99,5 % .....  | 86     |
| 5.8.3.  | Herstellung von CHIR-Konstrukten.....   | 88     |
| 5.8.4.  | Testtransfektion.....   | 89     |
| 5.8.5.  | 6 stabile und funktionierende Zelllinien: status quo der geplanten 23 stabilen .....  | 91     |
| 6.  | Diskussion .....  | 94     |
| 6.1.  | Primerdesign .....  | 94     |
| 6.2.  | Ergebnisse der Klonierung.....  | 95     |
| 6.2.1.  | Proteinebene .....  | 95     |
| 6.2.2.  | Nukleotidebene .....  | 98     |
| 6.3.  | 23 CHIR-Konstrukte .....  | 102    |
| 6.4.  | Ausblick .....  | 103    |
| 6.4.1.  | Ligandensuche.....  | 103    |
| 6.4.2.  | Untersuchung der Ig1-Domänen bzw. Ig2-Domänen auf Nukleotidebene .....  | 104    |
| 6.4.3.  | Untersuchung eines zweiten Huhns derselben Linie.....   | 104    |
| 7.  | Zusammenfassung.....  | 105    |
| 8.  | Summary .....   | 107    |
| 9.  | Literaturverzeichnis .....  | 109    |
| Anhang I: Exceltabellen.....                                  |   | CXII   |
| Anhang II: Bezugsquellen der Materialien und Chemikalien..... |   | CXXXIV |
| Anhang III: Geräte in alphabetischer Reihenfolge.....         |   | CXXXV  |



|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Strukturelle Faltung einer Ig-Domäne .....   | 2  |
| Abbildung 2: Vergleichende Darstellung des LRC von Mensch und Maus.....   | 6  |
| Abbildung 3: Darstellung der 2 verschiedenen Exon-Intron-Strukturen von CHIRs .....   | 7  |
| Abbildung 4: Genomische Organisation von CHIR-Genen.....  | 12 |
| Abbildung 5: Darstellung des Dimers von CHIR-AB1 .....  | 14 |
| Abbildung 6: pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor.....  | 29 |
| Abbildung 7: Zeta-Vektor.....   | 30 |
| Abbildung 8: Schema des $\beta$ -Galactosidase-Assays .....   | 38 |
| Abbildung 9: Darstellung der genomischen Sequenz von 46 – mit MegAlign verglichenen -<br>LSL-Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen im Anfangsbereich des Exons für die<br>Ig1- Domäne .....        | 46 |
| Abbildung 10: Darstellung der genomischen Sequenz von 46 – mit MegAlign verglichenen -<br>LSL-Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen im Endbereich des Exons für die<br>Ig2-Domäne .....            | 48 |
| Abbildung 11: Zusammengesetzte Consensussequenz der 46 LSL-Sequenzen zur Bestimmung<br>der Länge des Inserts .....  | 51 |
| Abbildung 12: Bild einer gelelektrophoretischen Auftrennung von 50 verschiedenen PCR-Produkten<br>aus einer Bakterien-PCR mit 50 Einzelkolonien als jeweilige Matrize .....                       | 52 |
| Abbildung 13: Genetische Karte der Sequenzierung von „M11 CHIR2-682“ in<br>pcDNA3.1 /V5-His-TOPO® .....   | 54 |
| Abbildung 14: Ausschnitt aus einer Exceltabelle zum Vergleich von 5 Proteinsequenzen von<br>CHIRs mit 2 Ig-Domänen.....   | 55 |
| Abbildung 15: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 142 M11-Proteinsequenzen.....  | 56 |
| Abbildung 16: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 142 M11-Nukleotidsequenzen .....   | 59 |
| Abbildung 17: Darstellung der 3 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen von 11 Sequenzen, die auf<br>Proteinebene identisch sind .....   | 61 |
| Abbildung 18: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 117 R11-Proteinsequenzen .....   | 66 |
| Abbildung 19: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 117 R11-Nukleotidsequenzen.....  | 68 |
| Abbildung 20: 3 Vergleiche der identischen Proteinsequenzen zwischen M11 und R11 .....  | 72 |
| Abbildung 21: Vergleich von „M11 CHIR2-687“ und „R11 CHIR2-881“ .....   | 73 |
| Abbildung 22: Darstellung der Zusammensetzung aus Ig1- und Ig2-Domäne bei den 3<br>- zwischen M11 und R11 - identischen Sequenzen .....   | 77 |
| Abbildung 23: Vergleich von „LSL-CHIR2-B9“ und „LSL CHIR2-B11“.....   | 80 |
| Abbildung 24: Vergleich von „LSL CHIR2-B9“ und „LSL CHIR2-B11“ in voller Länge .....  | 82 |
| Abbildung 25: Phylogenetischer Baum der 98 unterschiedlichen M11-Proteinsequenzen mit den 71<br>unterschiedlichen R11-Proteinsequenzen und den 50 unterschiedlichen<br>LSL-Proteinsequenzen ..... | 85 |
| Abbildung 26: Vergleich und Identitäten der 23 ausgewählten repräsentativen Sequenzen.....  | 88 |
| Abbildung 27: Durchflusszytometrische Daten der Testtransfektion von 293T-Zellen<br>mit 23 CHIR-Konstrukten.....  | 91 |

Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse und  $\beta$ -Galactosidase-Ansatz der  
6 stabilen Zelllinien ..... 93

Abbildung 29: Exceltabelle zur Darstellung der 142 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen  
des Huhns der Linie M11 ..... CXIV

Abbildung 30: Exceltabelle der 142 Nukleotidsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus  
dem Huhn der Linie M11 ..... CXVII

Abbildung 31: Vergleich aller auf Nukleotidebene identischen Sequenzen mit allen auf Proteinebene  
identischen Sequenzen der CHIR mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 ..... CXIX

Abbildung 32: Exceltabelle zur Darstellung der 117 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen  
des Huhns der Linie R11 ..... CXXII

Abbildung 33: Exceltabelle der 117 Nukleotidsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus  
dem Huhn der Linie R11 ..... CXXV

Abbildung 34: Vergleich aller auf Nukleotidebene identischen Sequenzen mit allen  
auf Proteinebene identischen Sequenzen der CHIR mit 2 Ig-Domänen des  
Huhns der Linie R11 ..... CXXVII

Abbildung 35: Exceltabelle der 169 Ig1-Domänen ..... CXXX

Abbildung 36: Exceltabelle der 169 Ig2-Domänen ..... CXXXIII

|  |        |
|--|--------|
| Tabelle 1: Auflistung der in der Herculase-PCR verwendeten Primer .....                          | 21     |
| Tabelle 2: Auflistung der in der HFP-PCR verwendeten Primer .....                                | 23     |
| Tabelle 3: Beschreibung der verwendeten Zelllinien .....   | 41     |
| Tabelle 4: Darstellung der 5 identischen Sequenzen zwischen unterschiedlichen Hühnerlinien ..... | 83     |
| Tabelle 5: Bezugsquellen der Materialien und Chemikalien .....                                   | CXXXIV |
| Tabelle 6: Liste der in dieser Doktorarbeit verwendeten Geräte.....                              | CXXXV  |

|               |  |
|---------------|--|
| Aqua bidest.  | Aqua bidestillata  |
| Aqua dest.    | Aqua destillata  |
| BAC           | bakterielles künstliches Chromosom<br>(engl. Bacterial Artificial Chromosome)                    |
| bp            | Basenpaare (engl. base pairs)  |
| BSA           | Bovines Serumalbumin   |
| Ca-Ionophor   | Calcium-Ionophor   |
| CD            | Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen<br>(engl. cluster of differentiation)        |
| cDNA          | komplementäre DNA (engl. complementary DNA)  |
| CHIR          | Chicken Ig-like Receptor   |
| CPRG          | Chlorophenolrot-beta-D-Galactopyranosid  |
| DAP12         | DNAX Aktivierungsprotein mit einer Größe von 12 kDa<br>(engl. DNAX Activation Protein of 12 kDa) |
| DAP10         | DNAX Aktivierungsprotein mit einer Größe von 10 kDa<br>(engl. DNAX Activation Protein of 10 kDa) |
| DEPC          | Diethylpyrocarbonate   |
| DMSO          | Dimethylsulfoxid   |
| DNA           | Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleid acid)  |
| dNTPs         | Desoxynucleosidtriphosphate<br>(engl. deoxynucleoside triphosphates)                             |
| E. coli       | Escherichia coli   |
| EDTA          | Ethylendiamintetraessigsäure<br>(engl. ethylendiamintetraacetic acid)                            |
| F             | Farad  |
| FACScan       | Fluorescence-Activated-Cell-Scanner  |
| Fc $\alpha$ R | Fc $\alpha$ - Rezeptor; Rezeptor für das Fc-Stück des IgA-Moleküls                               |
| Fc-Fragment   | konstante Region der schweren Kette des IgG Moleküls<br>(engl. fragment cristallizable)          |
| FcR           | Fc-Rezeptor  |
| FCS           | Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)   |
| FITC          | Fluorescein-Iso-Thiocyanat   |
| FSC           | Forward scatter  |
| G             | Gauge (Durchmesse einer Kanüle)  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| g                 | relative Zentrifugalkraft (engl. relative centrifugal force (RCF))   |
| GPVI              | Glykoprotein VI  |
| HFP               | hot fire polymerase  |
| I.E.              | internationale Einheiten   |
| Ig                | Immunglobulin  |
| Ig-SF             | Immunglobulin-Superfamilie   |
| ITAM              | Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv  |
| ITIM              | Immunrezeptor Tyrosin-basierendes inhibitorisches Motiv  |
| kDa               | Kilodalton   |
| KIR               | Killer-Zellen Ig-ähnlicher Rezeptor<br>(engl. Killer cell immunoglobulin-like receptor)                    |
| LAIR              | Leukozyten-assoziiertes Ig-ähnlicher Rezeptor<br>(engl. Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor) |
| LB                | Luria Broth  |
| LIR               | Leukozyten Ig-like Rezeptor<br>(engl. Leukocyte immunoglobulin-like receptor)                              |
| LP                | Lochplatte   |
| LRC               | Leukozyten-Rezeptor-Komplex<br>(engl. Leukocyte receptor complex)  |
| LSL               | Lohmann selected leghorn, in dieser Arbeit synonym für<br>„Weißes Leghorn Huhn“ verwendet                  |
| M                 | Molar (mol/l)  |
| mAK               | monoklonaler Antikörper  |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid   |
| MHC               | Haupthistokompatibilitätskomplex<br>(engl. major histocompatibility complex)                               |
| mRNA              | BotenRNA (engl. messenger RNA)   |
| NaOH              | Natronlauge  |
| NFAT              | nuclear factor of activated T-cells  |
| NK-Zellen         | Natürliche Killerzellen  |
| PBMC              | Periphere mononukleäre Zellen des Blutes<br>(engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells)                     |
| PBS               | Phosphat gepufferte Salzlösung<br>(engl. Phosphate Buffered Saline)  |

|           |   |
|-----------|---|
| PCR       | Polymerase Ketten Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)              |
| PE        | Phycoerythrin   |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin   |
| Pfu       | Pyrococcus furiosus (Bakterium)   |
| PIR       | Paired Ig-like Rezeptor   |
| PMA       | Phorbol-12-myristat-13-Acetat   |
| q         | Langer Chromosomenarm   |
| RE        | Restriktionsenzym   |
| RNA       | Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)                                 |
| rpm       | Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)                          |
| RPMI      | Rosewell Park Memorial Institute  |
| RT        | Raumtemperatur  |
| RT-PCR    | Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion                      |
| SAP       | Alkalische Phosphatase aus Shrimps<br>(engl. shrimp alkaline phosphatase) |
| SDS       | Natriumlaurylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)                        |
| SHP       | Src-homology-2 domain-containing-Protein-Tyrosin-Phosphatase              |
| SHIP      | Src-homology-2 domain-containing-Inositol-Polyphosphat-5'-<br>Phosphatase |
| SOC       | SOB (engl. super optimal broth)-Medium, dem Glucose<br>zugesezt ist       |
| SP        | Signalpeptid  |
| SSC       | Sideward scatter  |
| Taq       | Thermus aquaticus (Bakterium)   |
| TM        | transmembran  |
| V         | Volt  |

# 1. Einleitung

Das Huhn (*Gallus gallus*) ist ein wichtiger Modellorganismus, der eine Brücke über die evolutionäre Lücke zwischen Säugetieren und anderen Vertebraten schlägt [1]. Zusätzlich dient es als Hauptforschungsmodell für die ca. 9600 Vogelarten [1]. Somit helfen viele Erkenntnisse aus diesem Modellorganismus Ergebnisse von Untersuchungen an Säugetieren besser zu verstehen und liefern wichtige Hinweise für die Evolution. Obwohl sich das Hühnengenom und die Säugetiergenome seit ca. 310 Millionen Jahren in separaten Linien entwickeln, besitzen ca. 60 % der proteinkodierenden Hühnergene ein menschliches Ortholog [1].

Ein wichtiger Punkt der Forschung – sowohl beim Menschen als auch beim Vogel - ist die Nutzbarkeit der Ergebnisse für die Aufklärung der Ursachen von Krankheiten, für die Verhinderung und die Linderung dieser. Dafür ist ein Verständnis des Immunsystems unerlässlich. Ein wichtiger Bestandteil für das Verständnis des Immunsystems ist das Wissen über seine Rezeptoren, die Verteilung dieser auf den unterschiedlichsten Immunzellen und ihre Funktion. Eine Vielzahl dieser ist bereits eingehend untersucht, wie z.B. der B-Zell-Rezeptor, der T-Zell-Rezeptor, NK-Zell-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren und dies hat in bedeutendem Maße zum Verständnis der Vorgänge bei der Erkennung und Beseitigung von Pathogenen beigetragen. Einige allerdings wurden erst in den letzten Jahren entdeckt und bedürfen der weiteren Forschung. Zu diesen gehören z.B. viele Rezeptoren, die im Leukozyten-Rezeptor-Komplex (LRC) kodiert werden. So ist beispielsweise bei einigen von ihnen nicht bekannt, auf welchen Zellen des Immunsystems sie sitzen, ob sie der angeborenen oder adaptiven Immunität dienen, welche Liganden sie binden oder was ihre Funktion ist. Teilweise ist noch nicht einmal die Anzahl der verschiedenen Rezeptoren bekannt. Beim Huhn verhält dies sich so bei den im Jahr 2000 [2] entdeckten „chicken Ig-like receptors“ (CHIRs). Um das Wissen über diese zu erweitern, soll diese Rezeptorfamilie in der vorliegenden Doktorarbeit bei mehreren Hühnerlinien untersucht werden.

## 2. Literaturübersicht

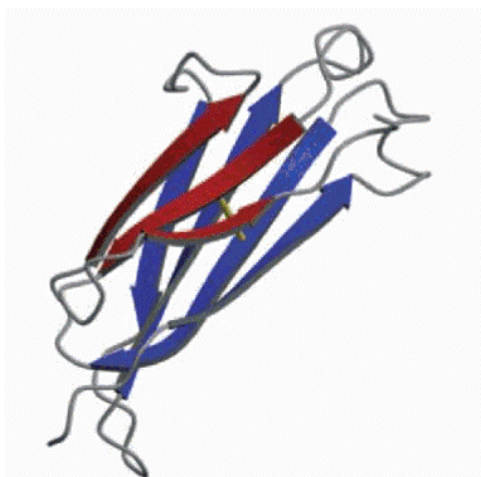
### 2.1. Definitionen

#### 2.1.1. Domäne

Eine „Domäne“ ist ein strukturell und/oder funktionell umschriebener Bereich eines Proteins, einer Nukleinsäure oder einer Membran. In einigen Genen entsprechen Domänengrenzen Exons [3]. So wird z.B. bei den CHIRs jede Immunglobulindomäne von einem Exon kodiert (s. 2.2.5.).

#### 2.1.2. Immunglobulindomäne

Die Bezeichnung „Immunglobulindomäne“ stammt aus der erstmaligen Beschreibung dieser bei der Strukturaufklärung der Immunglobuline (Antikörper) [4]. Unter dem Begriff der „Immunglobulindomäne“ versteht man eine bestimmte Grundart der Faltung einer Polypeptidkette. Die Basis aller Immunglobulin (Ig)- und Ig-ähnlichen Domänen bildet ein antiparalleles 3-strängiges  $\beta$ -Faltblatt, welches mit einem 4-strängigen  $\beta$ -Faltblatt über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Die  $\beta$ -Stränge sind über Helices, Schleifen oder andere Strukturen verbunden. Reste in den  $\beta$ -Strängen neigen zu einer Konservierung, wohingegen Reste in den Helices oder Schleifen eine größere Vielfalt zeigen [5]. In Abbildung 1 ist das Grundfaltungsmuster einer Ig-Domäne dargestellt.



**Abbildung 1: Strukturelle Faltung einer Ig-Domäne**

Die Abbildung ist aus [5] entnommen. Dargestellt ist die Ig-Faltung, die die Basis für alle Ig- und Ig-ähnlichen Domänen bildet. Diese Faltung besteht aus einem  $\beta$ -Blatt aus 3 antiparallelen  $\beta$ -Strängen und einem  $\beta$ -Blatt aus 4 antiparallelen  $\beta$ -Strängen, welche miteinander über eine Disulfidbrücke verbunden sind.



Die Ig-Domänen werden abhängig von der Anzahl der  $\beta$ -Stränge und dem Abstand der beiden Cysteine, die für die Disulfidbrücke verantwortlich sind, in Domänen vom V-Typ und vom C-Typ eingeteilt [6]. Die Bezeichnungen „V“ für „variabel“ und „C“ für „konstant“ stammen von der Identifizierung dieses Typs der Ig-Domäne in dem variablen Teil eines Antikörpermoleküls bzw. in dem konstanten Bereich.

Eine Domäne vom V-Typ oder eine V-Typ-ähnliche Domäne enthält 9  $\beta$ -Stränge und die beiden Cysteine, die die Disulfidbrücke bilden, liegen etwa 65 bis 75 Aminosäuren auseinander.

In einer C-Typ-Domäne ist der Abstand zwischen den beiden Cysteinen geringer und beträgt nur 55 bis 60 Aminosäuren und diese enthält nur 7  $\beta$ -Stränge. Eine weitere Unterteilung der C-Typ-Domäne in eine Domäne vom C1-Typ und eine vom C2-Typ wurde aufgrund konservierter Sequenzmuster in der C1-Typ-Domäne vorgenommen [6].

C2-Typ-Domänen sind charakteristisch für die Ig-Domänen der LRC-Gene [7]. Zudem kommen diese C2-Typ-Domänen unter anderem auch noch in Fc-Rezeptoren vor [8].

### 2.1.3. Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF)

Als Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF) werden all die Moleküle bezeichnet, die mindestens eine Ig-Domäne besitzen. Zu diesen zählen zahlreiche Moleküle, die an der Antigenerkennung oder an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind [4].

Somit sind auch die CHIRs Mitglieder der Ig-SF.

## 2.2. Leukozyten-Rezeptor-Complex (LRC)

### 2.2.1. Nomenklaturuneinigkeit: Leukozyten-Rezeptor-Complex oder Leukozyten-Rezeptor-Cluster

Nach Meinung von Volz, Wende, Laun und Ziegler [9] ist die treffendere Bezeichnung für den LRC „Cluster“ anstelle des „Complex“, da zu der Bezeichnung einer genetischen Region als „Complex“ die funktionelle Kooperation der Gene von unterschiedlichen Genfamilien - wie z.B. bei den Genen des MHC-Komplexes - gehören würde. Bis heute besteht kein Beweis für eine funktionelle Kooperation von LRC-Loci, die zu unterschiedlichen Genfamilien gehören.

Da der Begriff des „Complexes“ für den LRC allerdings weithin akzeptiert ist [9] wird er auch in dieser Arbeit für den Ausdruck „LRC“ verwendet.

### 2.2.2. Allgemeines

Der LRC ist die genomische Region, in der sehr viele Ig-ähnliche Rezeptoren kodiert werden [10]. Zu den Ig-ähnlichen Rezeptoren, die in diesem codiert werden, gehören die KIR, LILR, LAIR, PIR, NKp46, Glykoprotein VI, Fc $\alpha$ R und die CHIR [7, 10-12]. Der LRC ist speziesspezifisch unterschiedlich zusammengesetzt. Auf den Aufbau, die einzelnen Mitglieder bzw. Mitgliedsfamilien des LRC und deren Vorkommen wird im Nachfolgenden genauer eingegangen.

### 2.2.3. Rezeptortypen des LRC

Grundsätzlich gibt es 3 verschiedene Rezeptortypen innerhalb der Rezeptoren des LRC: hemmende, aktivierende und bifunktionelle Rezeptoren [10, 11, 13]. Häufig werden hemmende Rezeptoren zusammen mit aktivierenden Gegenspielern auf ein und derselben Zelle exprimiert [11, 14].

Die hemmenden Rezeptoren können die Aktivierung von Zellen abschwächen. Dies geschieht über das Vorhandensein von einem oder mehreren ITIM (immunoreceptor tyrosin-based inhibition motif)-Sequenzen in ihrem langen zytoplasmatischen Anteil. Eine ITIM-Sequenz ist eine Abfolge von 6 Aminosäuren mit dem Aufbau (I/V/L/S)-X-Y-X-X-(L/V) (X steht für jede beliebige Aminosäure, die anderen Buchstaben für den Einbuchstabencode der Aminosäuren und der „/“ bedeutet, dass eine dieser Aminosäuren auftreten kann). Dies bedeutet, dass die 1. Aminosäure entweder Isoleucin (I), Valin (V), Leucin (L) oder Serin (S) ist, hierauf folgt eine beliebige Aminosäure, dann die wichtige (s. unten) Aminosäure Tyrosin (Y), 2 beliebige Aminosäuren und dann Leucin oder Valin [15]. Die Bindung an die Rezeptoren führt zur Phosphorylierung des Tyrosins in dem ITIM durch eine Kinase der Src-Familie und zur folgenden Rekrutierung von Phosphatasen der SHP (Src-homology-domain-phosphatase)-Familie (SHP-1, SHP-2, SHIP), da das phosphorylierte Tyrosin eine Bindungsstelle für die SHPs zur Verfügung stellt. Diese Phosphatasen dephosphorylieren eine Anzahl von intrazellulären Substraten, neutralisieren stimulatorische Signale, die durch aktivierende Rezeptoren mediiert sind, und stoppen so eine weitere zelluläre Aktivierung [11, 16].

Aktivierende Rezeptoren besitzen kein ITIM oder andere erkennbare Signalmotive in ihrem zytoplasmatischen Anteil. Ihr Markenzeichen ist ein kurzer zytoplasmatischer Anteil und eine positiv geladene Aminosäure (wie z.B. Lysin oder Arginin) im transmembranen Abschnitt, die die Assoziation mit Adaptormolekülen für die weitere Signaltransduktion gewährleistet. Zu diesen Adaptormolekülen gehören z.B. DAP12, die FcεRIγ-Kette, CD3-ζ oder DAP10. Diese enthalten aktivierende, Tyrosin-enthaltende Signaltransduktionsmotive in ihren langen zytoplasmatischen Abschnitten. So besitzen DAP12, FcεRIγ-Kette, CD3-ζ ein ITAM (immunoreceptor tyrosin-based activation motif)-Motiv in ihrem zytoplasmatischen Bereich und DAP10 ein YXXM-Motiv. Das ITAM-Motiv (YXX(L/I)X<sub>6-8</sub>YXX(L/I)) besteht aus dem 2-maligen Vorhandensein des Motivs „YXX(L/I)“, welches durch 6-8 beliebige Aminosäuren getrennt ist [17]. Das YXXM-Motiv ist durch die Aminosäure Methionin an der 3.Stelle hinter dem Tyrosin gekennzeichnet [11]. Das zytoplasmatische ITAM wird nach Bindung an den Rezeptor phosphoryliert und aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden über die Rekrutierung von Proteintyrosin-Kinasen (z.B. Syk oder ZAP-70) [11, 16, 17].

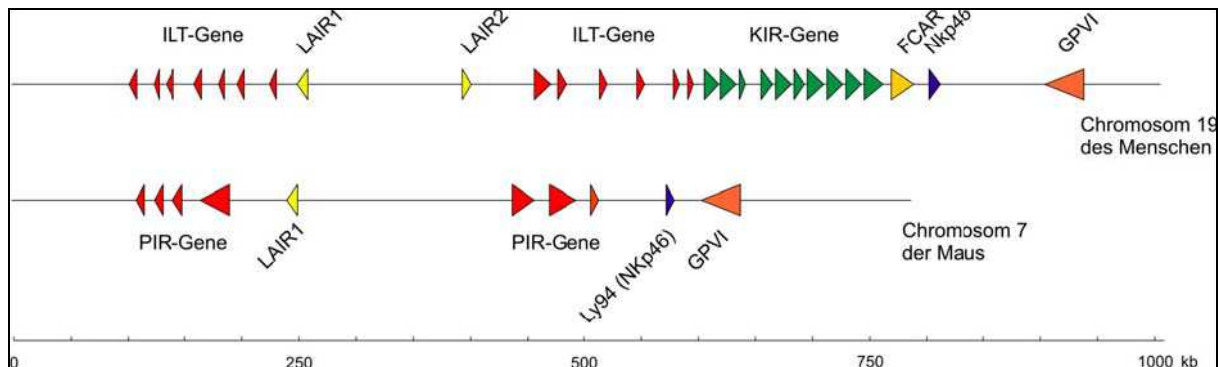
Bifunktionelle Rezeptoren kombinieren in ihrem Aufbau hemmende und aktivierende Merkmale und besitzen daher potenziell beide Eigenschaften [11, 18]. Somit besitzen diese z.B. eine transmembrane Region mit einem positiven Rest zusammen mit einem langen zytoplasmatischen Anteil, der 1 ITIM und 1 YXXM enthält. Oder sie weisen eine positiv geladene transmembrane Domäne in Kombination mit einem langen zytoplasmatischen Anteil, der ein ITIM und ein ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) - eine Modifikation des ITIMs - enthält, auf [11]. Das ITSM ist eine Abfolge von 6 Aminosäuren mit dem Aufbau „TXYXX(V/I)“ [19]. Außer den CHIR-AB gibt es in der KIR-Familie KIR2DL4, welches einen positiv geladenen transmembranen Rest mit einem zytoplasmatischen ITIM kombiniert. Allerdings hält man diesen Rezeptor eher für einen aktivierenden als hemmenden Rezeptor [11].

#### 2.2.4. Aufbau des LRC

Der Aufbau des LRC ist besonders beim Menschen eingehend untersucht [9, 20, 21]. Der LRC des Menschen liegt auf Chromosom 19q13.4, erstreckt sich über ca. 1 Megabasenpaar und enthält über 40 Gene [20-22]. Diese Gene können einzelne Gene sein wie z.B. das Gen für den Rezeptor für das Fc-Stück des IgA (FcαR) oder das Gen für das Glykoprotein VI (GPVI) oder auch Mitglieder von Genfamilien, wie

z.B. die KIR-Gene, die Mitglieder der KIR-Multigenfamilie sind [10]. Der menschliche LRC enthält einen Cluster an KIR-Genen, 2 Cluster von LILR-Genen, 2 LAIR-Gene und die Gene für den Fc $\alpha$ R, das GPVI und NKp46. Die beiden Cluster der LILR-Gene sind durch die beiden LAIR-Gene getrennt (s. Abbildung 2) [20]. Das zentromerische Ende des LRC ist definiert durch das RPS9-Gen [9]. Das telomerische Ende des LRC wird durch das GPVI gebildet.

Ein Vergleich des LRC des Menschen mit dem der Maus auf Chromosom 7 (s. Abbildung 2) zeigt, dass dieser keinen KIR-Cluster, aber 2 PIR-Gencluster enthält [22]. Zudem fehlt der Maus das Gen für den Fc $\alpha$ R, allerdings ist es in der Ratte vorhanden [22].



**Abbildung 2: Vergleichende Darstellung des LRC von Mensch und Maus**

Die Abbildung ist aus der Dissertation von Laun [23] entnommen. In der Abbildung ist der genomische Aufbau des LRC beim Menschen auf Chromosom 19 und bei der Maus auf Chromosom 7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die beiden Komplexe einen ähnlichen Aufbau besitzen, allerdings keinen identischen. So besitzt die Maus 2 PIR-Gencluster, die allerdings beim Menschen nicht vorhanden sind. Dieser besitzt 2 LILR-Gencluster (LILR werden in der Abbildung noch „ILT“ genannt), die bei der Maus nicht vorhanden sind. Allerdings liegen sowohl die Gene für das GPVI und den NKp46 in dem LRC der Maus und des Menschen. Die Spitzen der Gensymbole zeigen zum 3`-Ende der Gene.

Der LRC des Huhns liegt auf dem Mikrochromosom 31 [11]. Laun et al. [13] haben 103 CHIR-Loci in diesem gefunden (22 hemmende, 25 aktivierende, 15 bifunktionelle und 41 Pseudogene) und spekulieren, dass es sogar noch mehr CHIR-Gene in dem LRC geben könnte, da keine LRC-Rahmen-Loci in ihrer Analyse identifiziert werden konnten. Somit ist der LRC des Huhns im Vergleich zu dem des Menschen (über 40 Gene) sehr ausgedehnt. Im Gegensatz zu den Genfamilien der Säugetier-KIRs, -LILRs und -PIRs – bei denen die Gene, die in einem Cluster angeordnet sind, dieselbe Transkriptionsrichtung besitzen (s. Abbildung 2) - besitzen

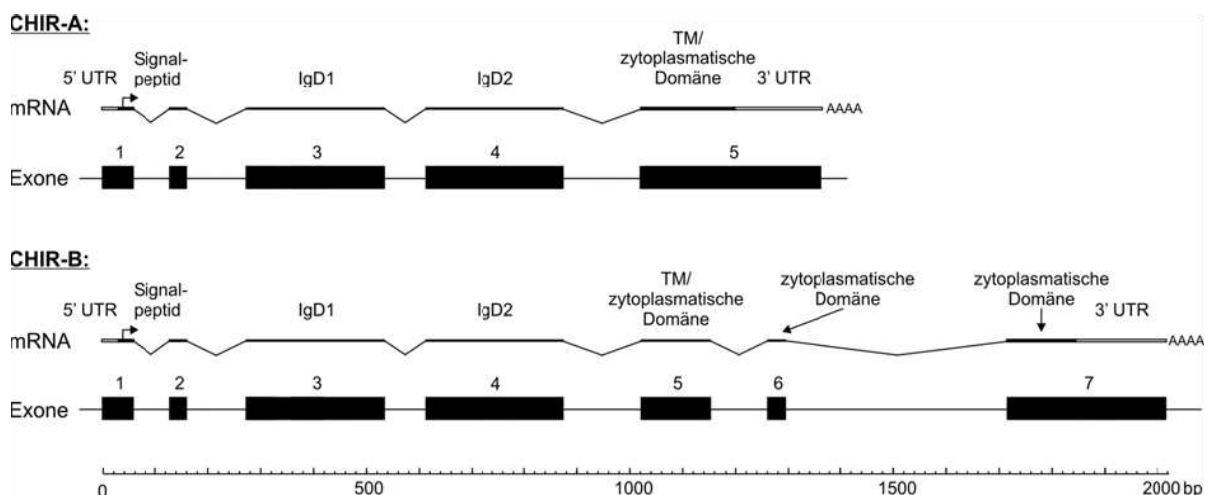
die Mitglieder der CHIR-Genfamilie keine Cluster, in denen alle Gene dieselbe Transkriptionsrichtung aufweisen [10, 23].

### 2.2.5. Exon-Intron-Struktur

Die Exon-Intron-Struktur der CHIR-Gene ist hoch konserviert [11, 23]. Laun konnte in ihrer Dissertation 2 verschiedene Exon-Intron-Konfigurationen (s. Abbildung 3) identifizieren, die sich hinsichtlich des Aufbaus bis einschließlich des 4. Exons gleichen: das Signalpeptid (SP) wurde durch 2 Exons kodiert, die beiden Ig-Domänen wurden jeweils von einem getrennten Exon kodiert. Die Ergebnisse der Untersuchung der Exon-Intron-Struktur der CHIR-Gene gleichen den Ergebnissen von Viertböck et al. [11].

Bei der ersten Exon-Intron-Struktur der 2 verschiedenen (s. Abbildung 3) folgte nun nur noch ein Exon, welches die Transmembrandomäne (TM) und einen kurzen zytoplasmatischen Bereich kodierte. Diese Exon-Intron-Konfiguration stellte CHIR-A-ähnliche Gene dar.

Bei der zweiten Exon-Intron-Struktur folgten neben dem 5. Exon, welches die TM-Domäne und einen Teil der zytoplasmatischen Domäne kodierte, 2 weitere Exone, die den Rest der zytoplasmatischen Domäne kodierten. Diese Genstruktur mit 7 Exons repräsentierte CHIR-B-ähnliche Gene.



**Abbildung 3: Darstellung der 2 verschiedenen Exon-Intron-Strukturen von CHIRs**

Der mit „CHIR-A“ überschriebene Teil der Abbildung stellt die Exon-Intron-Struktur von CHIR-A-ähnlichen Genen dar, der mit „CHIR-B“ überschriebene Teil die von CHIR-B-ähnlichen Genen. Die Exons sind durch schwarz gefüllte Kästchen dargestellt. Die beiden verschiedenen CHIR-Typen unterscheiden sich einschließlich des 4. Exons nicht in ihrer Exon-Intron-Struktur. Die Abbildung ist der Dissertation von Laun [23] entnommen.

Bei dem 5. Exon hat man 7 Größenvarianten gefunden [13]. Viertböck et al. [11] fanden heraus, dass in CHIRs mit nur einer Ig-Domäne ein Pseudoexon die 2. Ig-Domäne („IgD2“ in Abbildung 3) ersetzt.

Dieser Aufbau der CHIR-Gene ist ähnlich zu anderen Ig-ähnlichen Rezeptoren der Säugetiere [10].

Wie Laun in ihrer Dissertation herausfand [23] folgten alle CHIR-Exon-Intron-Grenzen der AG-GT-Regel (alle Introns enden an ihrem 3'-Ende mit Adenin und Guanin und beginnen an ihrem 5'-Ende mit Guanin und Thymin). Dies ist identisch mit den Exon-Intron-Sequenzen in KIR und LILR-Genen [16, 18].

Auch die Phasen der CHIR-Exons (bzgl. der extrazellulären Exons und des Exons, das die TM-Domäne kodiert) sind typisch für alle Ig-ähnlichen Rezeptoren [18]: die extrazellulären Exons und das Exon, das die Transmembrandomäne kodiert befinden sich in Phase 1. Laut Torkar et al. [24] ist die Phase der zytoplasmatischen Exons nicht konserviert. Diese befinden sich in einigen untersuchten CHIRs in Phase 0 [11]. In der Phase 0 ist das gesamte Basentriplett, das eine Aminosäure kodiert am 3'-Ende eines Exons vorhanden, wohingegen bei Exons in Phase 1 nur eine Base des kodierenden Triplets am 3'-Ende des Exons vorhanden ist. Dementsprechend haben Exons in Phase 2 zwei Basen des kodierenden Basentriplets an ihrem 3'-Ende [18].

## 2.2.6. Mitglieder des LRC

### 2.2.6.1. KIR

Die „killer cell Ig-like receptors“ (KIR) wurden ursprünglich „killer cell inhibitory receptors“ genannt [21]. Dies lässt auf ihre ursprünglich entdeckte Funktion schließen, die cytotoxische Aktivität der NK-Zellen und einer Unterklasse von T-Zellen negativ zu regulieren. Die neuere Bezeichnung lässt auf die Zugehörigkeit der KIRs zu der Ig-SF schließen [21]. Neben den hemmenden KIRs sind auch aktivierende KIRs entdeckt worden (früher „KARs“ genannt). Im Gegensatz zu den hemmenden KIRs führt die Interaktion der aktivierenden KIRs mit ihren Liganden zur NK- und T-Zell-Aktivierung [21].

Die KIRs enthalten 2 oder 3 Ig-SF-Domänen („KIR2D“ bzw. „KIR3D“) [22] und die meisten erkennen mit diesen verschiedene MHC-Klasse-I-Moleküle [11]. Mit diesen findet eine Interaktion an den hochpolymorphen  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen statt [9].

Die Anzahl der KIR-Gene zeigt haplotypische Unterschiede und es besteht ein großer allelischer Polymorphismus [16]. Neben dem Menschen sind KIRs auch beim Rind beschrieben [25] und bei Primaten [22].

#### **2.2.6.2. LILR**

Die „leukocyte Ig-like receptors“ (LILR) werden auch LIR [22] [26], „Ig-like Transcripts“ (ILT) [27] oder „monocyte/macrophage inhibitory receptor“ (MIR) [28] genannt [20]. Sie werden auf einer großen Spannweite von myeloiden und lymphoiden Zellen exprimiert [11]. Neben hemmenden Rezeptoren gibt es auch einen aktivierenden Rezeptor LILRA2 (=ILT1).

Die LILRs besitzen als Mitglieder der Ig-SF in ihrem extrazellulären Bereich Ig-ähnliche Domänen. Die Anzahl dieser beträgt 2 oder 4 [21].

Im Gegensatz zu den KIRs zeigen die LILR-Gene einen geringen Grad des Polymorphismus [9].

Über ihre Liganden ist noch nicht viel bekannt [18], allerdings weiß man, dass LILRB1 (=ILT2=LIR1) und LILRB2 (=ILT4=LIR2) an MHC-Klasse-I-Moleküle binden [20]. Im Gegensatz zu den KIR-Molekülen treten sie aber über die konservierte  $\alpha 3$ -Domäne der MHC-Moleküle mit diesen in Kontakt [9].

Beim Menschen enthalten die beiden LILR-Cluster 6 bzw. 7 Gene [22].

Neben dem Menschen kommen LILR-Gene auch in Primaten vor [22].

#### **2.2.6.3. LAIR**

Die „leukocyte-associated Ig-like receptors“ (LAIR) werden auf PBMCs exprimiert. Diese Familie besteht nur aus 2 Mitgliedern (LAIR1 und LAIR2). Lebbink et al. identifizierten Kollagen als Liganden sowohl für LAIR1 als auch für LAIR2 [29].

Neben den beiden Rezeptoren beim Menschen ist 2004 das Maus-Homolog zu LAIR1 identifiziert worden [30].

#### **2.2.6.4. PIR**

Die „Paired Ig-like Receptors“ (PIR) kommen in Form von aktivierenden (PIR-A) und hemmenden (PIR-B) Rezeptoren vor [2]. Aufgrund des Vorhandenseins von Transkripten beider Arten von Rezeptoren in derselben Zellart wurden sie als „gepaart“ (paired) bezeichnet [18].

Sie besitzen 6 Ig-ähnliche Domänen in ihrem extrazellulären Bereich und werden auf myeloiden, dendritischen und B-Zelllinien exprimiert. Es gibt ca. 8 PIR-A-Gene und 1 PIR-B-Gen bei der Maus. Daneben sind PIR-Gene auch bei der Ratte identifiziert [2]. Ihre Funktion besteht in der Modulation der Aktivität von den Zellen, auf welchen sie exprimiert werden und somit sowohl bei angeborenen als auch bei adaptiven Immunantworten [2].

Die Liganden der PIRs sind bis heute unbekannt. Allerdings wird angenommen, dass es sich um MHC-Klasse-I-Moleküle handelt [23].

#### **2.2.6.5. CHIR**

Die „chicken Ig-like receptor“ (CHIR)-Familie wurde im Jahr 2000 von Dennis et al. [2] bei einer Durchsuchung von EST-Datenbanken mit der Aminosäuresequenz der extrazellulären Region von PIR-B beim Huhn entdeckt. Die beiden entdeckten Sequenzen wurden in Anlehnung an die Nomenklatur der PIRs (-A für potentiell aktivierende Rezeptoren, -B für potentiell hemmende Rezeptoren) entsprechend ihres Aufbaus des transmembranen und zytoplasmatischen Teils „CHIR-A“ und „CHIR-B“ bezeichnet. Dementsprechend besitzt CHIR-A eine kurze zytoplasmatische Domäne und einen geladenen Rest im transmembranen Bereich. CHIR-B besitzt einen langen zytoplasmatischen Anteil mit 2 ITIMs und einen ungeladenen Transmembranbereich. Beide Rezeptoren besitzen in ihrem extrazellulären Bereich 2 Ig-ähnliche Domänen. Eine Expression ist auf B- und T-Zelllinien gezeigt worden. „CHIR-A“ ist nach der Entdeckung von weiteren aktivierenden CHIRs in „CHIR-A1“ umbenannt worden und „CHIR-B“ in „CHIR-B1“ [18].

Viertlböck et al. [16] entdeckten 2004 3 neue hemmende Rezeptoren (CHIR-B2 bis CHIR-B4) beim Huhn, die in ihrem Aufbau dem - von Dennis et al. beschriebenen [2] - hemmenden CHIR-B entsprachen. Somit hatten sie extrazellulär auch 2 Ig-Domänen. Durch einen mAK gegen CHIR-B2 konnten sie die Expression dieses auf allen B-Zellen und einer kleinen Gruppe von T-Zellen nachweisen, nicht aber auf Monozyten oder Thrombozyten. Sie konnten zudem zeigen, dass CHIR-B2 die zelluläre Proliferation hemmt und vermuteten dies als die wahrscheinliche Funktion auf B-Zellen.

2005 wurden 6 neue CHIRs entdeckt: ein aktivierender CHIR, CHIR-A2, 2 weitere hemmende Rezeptoren, CHIR-B5 und -B6, und 3 Mitglieder einer für diese Familie neuen Art an Rezeptortypen, bifunktionelle Rezeptoren „CHIR-AB“. CHIR-AB1 bis

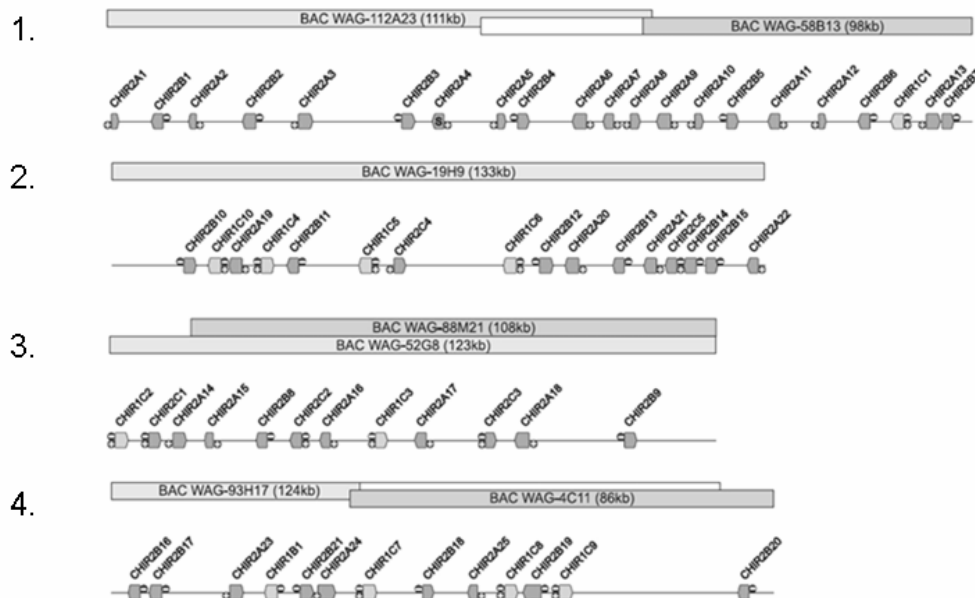


CHIR-AB3 enthielten alle einen langen zytoplasmatischen Anteil mit einem ITIM, zusätzlich aber einen positiv geladenen Rest in der Transmembranregion. Neben dem C-terminalen ITIM wurde bei CHIR-AB1 und CHIR-AB2 an der Stelle des N-terminalen ITIMs noch ein „YXXM“-Motiv festgestellt. Bei CHIR-AB3 befand sich das ITIM an der N-terminalen ITIM-Position und an der C-terminalen Stelle lag ein ITSM vor. Neben dem Unterschied im transmembranen und zytoplasmatischen Aufbau unterschieden sich die neu gefundenen CHIRs auch in der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen: CHIR-AB1 und CHIR-AB2 besaßen – im Gegensatz zu den anderen neu gefundenen CHIRs und auch im Gegensatz zu den schon identifizierten CHIR-B2 bis –B4 und CHIR-A und CHIR-B – nur eine extrazelluläre Ig-Domäne. Bei CHIR-B6 wurde eine weitere Besonderheit beschrieben: trotz des Fehlens eines positiven Restes in der Transmembranregion – was auf einen hemmenden Rezeptor hinwies – besaß dieser Rezeptor keinen langen zytoplasmatischen Anteil und keine ITIMs. Auch CHIR-B5 besaß nicht die bisher für CHIR-B beschriebenen 2 ITIMs in seinem zytoplasmatischen Anteil, sondern neben einem ITIM ein ITSM [11].

Neben diesen vielfältigen Strukturvarianten von CHIRs entdeckten Viertlböck et al. [11] durch Southern-blot-Analysen mit Sonden für die Ig1-Domäne, dass die CHIRs eine große Multigenfamilie bilden. Zusätzlich wurden mit Hilfe eines Primerpaars für die Ig1-Domäne von CHIRs aus einem einzigen Tier 103 Sequenzen kloniert, von denen 41 unterschiedlich waren.

2006 untersuchten Laun et al. [13] den LRC des Huhns mit Hilfe der Sequenzierung von BAC-Klonen aus der „Wageningen genomischen Hühner-BAC-Bibliothek“ (diese ist hergestellt aus Blutzellen eines weiblichen Weißen Leghorn Huhns, im weiteren „LSL“ (Lohman selected leghorn) genannt). Sie entdeckten 103 CHIR-Loci. Anhand des Aufbaus teilten sie diese in 22 potentiell hemmende, 25 potentiell aktivierende, 15 potentiell bifunktionelle und 41 Pseudogene ein. Von den 62 Nicht-Pseudogenen besaßen 51 zwei extrazelluläre Ig-Domänen und 11 eine Ig-Domäne (s. Abbildung 4). Allerdings wurden nur 7 der ursprünglich 18 – bei der Durchmusterung der Bibliothek mit CHIR-spezifischen cDNA-Sonden – positiven BAC-Klone sequenziert. Von diesen 7 Klonen überlappten nur 58B13 mit 112A23 und 93H17 mit 4C11. Der Klon 88M21 lag gesamt innerhalb von 52G8 und es konnten keine weiteren Überlappungen zwischen den 7 Klonen festgestellt werden. Daher wird der CHIR-Gencluster in dieser Arbeit durch 4 Sequenzabschnitte (insgesamt 550

Kilobasenpaare) von unbekannter Anordnung und Orientierung (s. Abbildung 4) repräsentiert.



**Abbildung 4: Genomische Organisation von CHIR-Genen**

Die Abbildung zeigt die Lage der 62 als funktionell charakterisierten Gene auf 4 unterschiedlichen DNA-Bereichen aus BAC-Klonen eines LSL-Huhns. Dunkelgraue Gensymbole stehen für CHIRs mit 2 Ig-Domänen („CHIR2“) und hellgraue Gensymbole stehen für CHIRs mit einer Ig-Domäne („CHIR1“). Ein „+“ neben dem Gensymbol steht für CHIRs mit aktivierender transmembraner Domäne, ein „-“ steht für ein CHIR mit ITIM-Motiven im zytoplasmatischen Anteil. Ein „S“ im Gensymbol kennzeichnet das Fehlen eines Cysteins in der Ig-Domäne, welches zu strukturellen Problemen führt. Die Spitze der Gensymbole gibt die Orientierung des jeweiligen Gens innerhalb des BAC-Inserts an und zeigt in Richtung des 3'-Endes. Abbildung modifiziert nach [13].

Aufgrund der Lücken zwischen den sequenzierten BAC-Klonen und dem Fehlen von identifizierbaren Rahmenloci vermuteten die Autoren, dass es – bei dieser Hühnerlinie - noch mehr CHIR-Gene geben muss. Bezüglich der Nomenklatur verfahren die Autoren folgenderweise: alle – vom Aufbau her – aktivierenden CHIRs bezeichneten sie mit „A“, alle potentiell hemmenden Rezeptoren mit „B“ und alle potentiell bifunktionellen Rezeptoren mit „C“ (anstelle von „AB“ wie von Viertelboeck et al. [11] vorgeschlagen). Vor der Angabe der Buchstaben „A“, „B“, oder „C“ wurde noch die Anzahl der Ig-Domänen (1 oder 2) gesetzt. Da es mehr als einen Rezeptor von jedem Typ gab, wurde als letztes – nach dem Buchstaben „A“, „B“ oder „C“ –

noch eine Nummer gehängt. Somit ergab sich z.B. die Bezeichnung „CHIR2B10“ für einen – nach dem Aufbau seiner TM-Domäne und seines zytoplasmatischen Anteils – potentiell hemmenden Rezeptor mit **2** extrazellulären Ig-Domänen. Somit wurde dem Nomenklaturvorschlag von Nikolaidis et al. [10], der sich an der Nomenklatur für die menschlichen KIR-Gene orientierte, keine Bedeutung geschenkt. Die Vorschläge dieser Autoren waren: „2DL“ für CHIRs mit 2 Ig-ähnlichen Domänen und einem langen zytoplasmatischen Anteil; „2DS“ für CHIRs mit 2 Ig-ähnlichen Domänen, einem kurzen („short“) zytoplasmatischen Anteil und einem positiv geladenen transmembranen Rest und „1DLA“ bzw. „2DLA“ für CHIRs mit 1 bzw. 2 Ig-ähnlichen Domänen, die einen langen zytoplasmatischen Anteil und eine geladene TM-Domäne besitzen.

Im Jahr 2007 wurde der erste Ligand für ein Mitglied der CHIR-Familie – für CHIRAB1 - gefunden: das Fc-Stück des IgY [14]. Beim Säuger haben sich aus dem primordialen Molekül, aus welchem beim Vogel das IgY entstanden ist, 2 verschiedene Moleküle (IgE und IgG) entwickelt. CHIR-AB1 ist ein potentiell bifunktionaler Rezeptor mit 1 extrazellulären Ig-Domäne, einer basischen Ladung im transmembranen Bereich und einem zytoplasmatischen ITIM. Zu diesem ITIM besitzt CHIR-AB1 in seinem zytoplasmatischen Bereich noch ein YXXM-Motiv [11]. Weiterhin fanden die Autoren heraus, dass dieser „Fcγ-Rezeptor“/CHIR-AB1 das Fc-Stück des IgY mit hoher Affinität bindet. Expressionsuntersuchungen ergaben, dass CHIR-AB1 auf unreifen und reifen B-Lymphozyten, auf Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert wird.

Vor kurzem wurde durch Arnon et al. [31] die Ektodomäne von CHIR-AB1 kristallisiert. Diese C2-Typ Ig-Domäne (s. auch 2.1.2) kristallisierte als symmetrisches Homodimer. Allerdings ist die Dimerisierung nicht obligat und sie ist unabhängig vom Vorhandensein von FcY. Der größte Teil der Dimerisationsoberfläche bestand aus der N-terminalen Spitze der CHIR-AB1-Ig-ähnlichen Domäne und die beiden Untereinheiten des Homodimers waren an ihrem C-terminalen Ende getrennt (s. Abbildung 5). Auch wurde die Ig-ähnliche Faltung mit 2 antiparallelen  $\beta$ -Blättern, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind, in dieser Arbeit bestätigt. Als nächster Strukturhomologer ist die D1-Domäne von NKp46 identifiziert worden.



#### **Abbildung 5: Darstellung des Dimers von CHIR-AB1**

Ein CHIR-AB1-Molekül ist als Band-Diagramm dargestellt, das andere als eine Oberflächenrepräsentation. Zu sehen ist die Dimerisation im N-terminalen Bereich, der C-terminale Bereich jedes der beiden Untereinheiten des Moleküls bleibt frei. Am Banddiagramm sind die  $\beta$ -Stränge der Ig-ähnlichen Domäne mit Buchstaben bezeichnet. Die Abbildung stammt aus [31].

#### **2.2.6.6. NKp46**

Ein weiterer Rezeptor der Ig-SF, der im LRC bei Mensch und Maus lokalisiert ist, ist NKp46. Dieser heißt auch MAR-1 (mouse activating receptor 1) bzw. KILR (killer cell Ig-like receptor) bei der Ratte [2] oder NCR1 (natural cytotoxicity-triggering receptor 1) [22]. NKp46 enthält in seinem extrazellulären Bereich 2 Ig-ähnliche Domänen [32] und wird nur auf NK-Zellen exprimiert. Er ist ein starker Aktivator [33]. Die Liganden von Nkp46 sind weitgehend unbekannt, allerdings ist das Hämagglutinin des Influenza-Virus als Ligand identifiziert worden [34]. Der Rezeptor ist bei Ratte, Mensch, Maus und Rind identifiziert [33, 35, 36].

**2.2.6.7. GPVI**

Clemetson et al. [37] klonierten den Kollagenrezeptor Glykoprotein (GP) VI. Dieser gehört zur Ig-SF, hat 2 extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen und einen positiv geladenen Rest in der transmembranen Domäne. Er wird auf Thrombozyten exprimiert, hat eine aktivierende Funktion und wird neben dem Menschen auch in der Maus gefunden [38].

**2.2.6.8. Fc $\alpha$ R**

Der Rezeptor für das Fc-Stück des IgA wird auch CD89 (cluster of differentiation 89) genannt [39]. Er besitzt 2 Ig-ähnliche Domänen, eine hydrophobe transmembrane Region und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil. Er wird auf Monozyten, Makrophagen, polymorphkernigen Neutrophilen und Eosinophilen exprimiert. Im Gegensatz zu anderen Fc-Rezeptoren des Menschen befindet sich das Gen für den Fc $\alpha$ R im LRC auf Chromosom 19, wohingegen z.B. Fc $\gamma$ R und Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$  auf dem menschlichen Chromosom 1 liegen. Nach Wines et al. [40] ist der Fc $\alpha$ R der am weitesten entfernte verwandte Fc-Rezeptor innerhalb der FcR-Familie. Er ist ein aktivierender Rezeptor.

Neben dem Menschen ist der Fc $\alpha$ R auch in Pferd, Kuh und Ratte identifiziert.

### 3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen eine Aussage über die Variabilität der CHIRs beim Haushuhn zu treffen und zum anderen stabil – mit einzelnen repräsentativen CHIRs – transfizierte Zelllinien zu etablieren, mit Hilfe derer Liganden für verschiedene CHIRs gesucht werden können.

Dazu wurden im Einzelnen folgende Teilziele angestrebt:

- Design eines Primerpaars, mit Hilfe dessen möglichst viele verschiedene CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus dem Genom kloniert werden können
- Beurteilung der Variabilität der CHIRs in Hühnern unterschiedlicher Linien
- Beurteilung der Konservierung von CHIRs zwischen unterschiedlichen Hühnerlinien
- Auswahl repräsentativer CHIRs für die Ligandensuche
- Auswahl eines geeigneten Systems für die Ligandensuche
- Herstellung stabil transfizierter Zelllinien für die Ligandensuche

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Tiere und Tierhaltung

Die in dieser Arbeit verwendeten Hühner (Linie M11 (B2/B2) und Linie R11 (B15/B15)) wurden von unserem Institut als befruchtete Eier von S. Weigend, Mariensee bezogen und am Institut bebrütet. Nach dem Schlupf wurden die Hühner in Gruppen in Volieren gehalten und mit handelsüblichem Alleinfutter und Wasser ad-libitum versorgt. Die Blutentnahmen und falls durchgeführt auch die Organentnahme wurden im Alter von 8-16 Wochen vorgenommen.

### 4.2. Präparation von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) aus dem Blut

#### 4.2.1. Material

**5 ml Spritze** <sup>10</sup> \*

**20 G-Kanüle** <sup>10</sup>

**50 ml Falcon** <sup>14</sup>

#### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

8,0 g Natriumchlorid (NaCl) <sup>1</sup>

1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-di-Hydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) <sup>1</sup>

0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) <sup>1</sup>

0,2 g Kaliumchlorid (KCl) <sup>1</sup>

1 x PBS: ad 1000 ml Aqua dest.

10 x PBS: ad 100 ml Aqua dest.

auf pH 7,2 eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt

Für den Gebrauch in der Zellkultur wurde das PBS autoklaviert und danach bei 4 °C aufbewahrt.

#### **Heparin-Lösung (500 I.E./ml)**

1 ml Heparin-Natrium-250.000 <sup>13</sup>

49 ml RPMI 1640 <sup>6</sup>

---

\* Hochzahlen beziehen sich auf die Bezugsquelle der Materialien und Chemikalien, die im Anhang II alphabetisch sortiert zusammen mit der entsprechenden Hochzahl aufgeführt ist

**Biocoll separating Solution (buffered with 1mM HEPES) <sup>2</sup>****Trypanblau <sup>2</sup>****4.2.2. Durchführung**

Die 5 ml-Spritze wurde unter der sterilen Werkbank mit ca. 0,1 ml Heparin-Lösung benetzt. Die Blutentnahme erfolgte mit dieser heparinisierten Spritze und einer 20 G-Kanüle an der V. jugularis dextra nach vorhergehender Desinfektion der Haut an der Einstichstelle mit 70%igem Alkohol. Anschließend wurden die entnommenen 5 ml Blut in einem 50 ml-Falcon mit 5 ml PBS verdünnt und diese 10 ml vorsichtig auf 10 ml Biocoll separating Solution in einem neuen 50 ml-Falcon geschichtet. Nach 12-minütiger Zentrifugation bei RT und 650 x g konnten die - sich in der weißlichen Interphase befindlichen - PBMCs mit einer Pipette abgesaugt werden und in ein neues 50 ml-Falcon pipettiert werden. Hierauf wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation über 10 Min. bei 4 °C und 225 x g) und am Ende in 5 ml PBS aufgenommen. Eine Probe der Zellsuspension à 15 µl wurde 1:2 mit Trypanblau vermischt, mit Hilfe einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer die Zellzahl bestimmt und die Zellen anhand der Anfärbung mit Trypanblau auf ihre Lebendigkeit beurteilt.

**4.3. RNA-Präparation**

Um die RNA aus den PBMCs zu gewinnen wurde das Kit „Absolutely RNA™RT-PCR-Miniprep Kit 50 Preps“ von Stratagene verwendet. Aufgrund der Gefahr der ubiquitär vorhandenen RNasen wurde nur mit Handschuhen und speziellem RNase-freien Einwegmaterial unter der sterilen Werkbank gearbeitet. Arbeitsoberflächen, Geräte und Gegenstände wurden vor Arbeitsbeginn mit 10%igem SDS abgewischt.

**4.3.1. Material****Kit Absolutely RNA™RT-PCR-Miniprep Kit 50 Preps <sup>18</sup>****10%iges SDS**

10 g SDS granuliert <sup>1</sup>

Ad 100 ml Aqua dest.

**RNase-freier Ethanol 70%ig**



|   |    |                              |
|---|----|------------------------------|
| 7 | ml | Ethanol absolut <sup>1</sup> |
| 3 | ml | Wasser <sup>1</sup>          |

### **RNase-freie Spitzen <sup>14</sup>**

### **5 ml Spritze <sup>10</sup>**

### **20 G-Kanüle <sup>10</sup>**

#### **4.3.2. Durchführung**

1 x 10<sup>7</sup> Zellen aus der PBMC-Präparation (s. 4.2.) wurden in ein 2 ml-Cup pipettiert und bei 1000 x g 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wurde aspiriert und verworfen. Zu dem Zellpellet wurde die entsprechende Menge an Lyse-Puffer--β-Mercaptoethanol (ME)-Mischung gegeben (4,2 µl β-ME in 600 µl Lyse-Puffer), um die Zellen zu lysieren. Mit der 20 G-Kanüle, die auf einer 5 ml-Spritze aufgesetzt war, wurde die gesamte Probe durch wiederholtes Einziehen in die Spritze und Ausdrücken aus der Spritze homogenisiert.

700 µl des Homogenisates wurden in ein mitgeliefertes „Prefilter Spin Cup“, welches in ein 2 ml-Aufnahmecup gesteckt wurde, übertragen und 5 Min. bei 16100 x g zentrifugiert, um größere Partikel zu entfernen und die Menge an DNA zu reduzieren. Nach Entfernung und Entsorgung des „Prefilter Spin Cups“ wurden 700 µl 70%iger RNase-freies Ethanol zum Filtrat gegeben und 5 Min. gevortext. 700 µl dieser Ethanol-Filtrat-Mischung wurden dann in das „Fiber-Matrix-Spin-Cup“, welches für die RNA-Bindung verantwortlich ist und in ein neues Aufnahmecup gesteckt wurde, übertragen und 60 Sek. bei 16100 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrates bei herausgenommenem „Fiber-Matrix-Spin-Cup“ wurden die zweiten 700 µl der Ethanol-Filtrat-Mischung in das „Fiber-Matrix-Spin-Cup“-in-dem-Aufnahmecup pipettiert und wiederum 60 Sek. bei 16100 x g zentrifugiert, das Filtrat bei herausgenommenem „Fiber-Matrix-Spin-Cup“ verworfen und das „Fiber-Matrix-Spin-Cup“ zurück in das Aufnahmecup gesteckt. Um noch vorhandene DNA zu entfernen wurde ein Waschschrift mit einem „low-salt-wash-buffer“ und ein Verdau mit der „RNase-Free DNase I“ durchgeführt. Drei weitere Waschschriffe - zuerst mit „high-salt-wash-buffer, dann 2 x mit „low-salt-wash-buffer“ - sorgten für das Entfernen der DNase. Nach einem zweiminütigen Zentrifugationsschritt, um die Fiber-Matrix zu trocknen, wurde das trockene „Fiber-Matrix-Spin-Cup“ in ein neues 1,5 ml-Cup

transferiert und die RNA wurde mit 50 µl warmem (60 °C) „Elution buffer“ nach zweiminütiger Inkubation bei RT durch Zentrifugation eluiert.

#### **4.4. cDNA-Synthese**

Für die Generierung der cDNA aus RNA wurde das „ThermoScript™ Reverse Transcriptase-PCR System“ von Invitrogen verwendet. Auch hier wurde auf RNase-freies Arbeiten wie bei der Präparation der RNA geachtet (s. 4.3.). Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Am Ende wurde zu der Reaktion 80 µl DEPC-behandeltes Wasser von Invitrogen gegeben, so dass das Endvolumen 100 µl betrug.

#### **4.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die PCR (polymerase chain reaction) wird verwendet, um in vitro DNA zu vervielfältigen. Prinzipiell besteht die PCR aus 3 Schritten: Denaturierung, Primerhybridisierung und darauf folgend die Elongation. Während der Denaturierung wird durch eine Erhitzung auf 94 °C bis 96 °C der doppelsträngige DNA-Strang getrennt. Hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die den DNA-Doppelstrang zusammenhalten aufgebrochen. Im zweiten Schritt, der Primerhybridisierung, wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum für die Primerbindung gebracht und diese Temperatur 30 Sek. gehalten. Die genaue Temperatur wird hierbei durch die Länge und Sequenz der Primer bestimmt.

In der darauf folgenden Elongationsphase wird der komplementäre DNA-Strang durch die DNA-Polymerase unter der für die entsprechende Polymerase jeweils spezifischen Temperatur synthetisiert. Diese 3 Hauptschritte werden dann 25-50 Mal wiederholt. Am Ende erfolgt in der Regel noch eine 10-minütige Erhitzung auf das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, damit eventuell noch nicht fertig-synthetisierte Stränge abgeschlossen werden können. Als letzter Schritt wird das PCR-Produkt auf 4 °C heruntergekühlt.

Hier wurden je nach Bedarf 2 unterschiedliche DNA-Polymerasen verwendet: die Herculase® enhanced DNA Polymerase und die Hot FIREPol® (ihr Arbeitsoptimum liegt bei 72 °C). Der Vorteil der Herculase® enhanced DNA Polymerase ist ihre „proof-reading“-Eigenschaft, d.h. diese Polymerase überprüft während der Synthese selbst noch einmal, ob die gerade eingebaute Base die Richtige war und bessert

diese gegebenenfalls auch aus. Aus diesem Grund wurde die Herculase® enhanced DNA Polymerase für PCRs verwendet, deren Produkte danach in Vektoren kloniert wurden. Auch ihr Arbeitsoptimum liegt bei 72 °C.

Da es sich bei der Hot FIREPol® um eine hotstart Polymerase handelt, wurde zu Beginn das PCR-Reaktionsgemisch 15 Min. auf 96 °C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren.

#### 4.5.1. Herculase-PCR

##### 4.5.1.1. Material

**Herculase®Enhanced DNA Polymerase** <sup>18</sup>

**10 x Herculase Puffer** <sup>18</sup>

**Wasser** <sup>1</sup>

**dNTP Mix** <sup>19</sup>

**Primer 100 pmol/µl** <sup>9</sup>

| <b>Primerbezeichnung mit Orientierung ( )</b> | <b>Sequenz</b>             | <b>Enzymschnittstelle</b> | <b>Temperatur (°C)</b> |
|---|----------------------------|---------------------------|------------------------|
| 1253 (sense)                                  | GAATTCCTGCCCGACCCTCCCTG    | EcoRI                     | <b>60</b>              |
| 1254 (antisense)                              | GAATTCTGCAGGTGTGGGTGTCAC   | EcoRI                     | <b>60</b>              |
| 1266 (sense)                                  | ATGAATTCCTGCCCGACCCTCCCTG  | EcoRI                     | <b>60</b>              |
| 1267 (antisense)                              | ATGAATTCTGCAGGTGTGGGTGTCAC | EcoRI                     | <b>60</b>              |

**Tabelle 1: Auflistung der in der Herculase-PCR verwendeten Primer**

#### 4.5.1.2. Durchführung

Für einen einfachen Ansatz wurden folgende Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge gemischt:

|     |    |   |
|-----|----|---|
| 2,8 | µl | Wasser  |
| 1,5 | µl | 10 x Herculasepuffer  |
| 1,5 | µl | dNTP Mix 2,0 mM, Endkonzentration: 0,2 mM                           |
| 3,0 | µl | Sense-Primer, 1:100 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 20 mM     |
| 3,0 | µl | Antisense-Primer, 1:100 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 20 mM |
| 0,2 | µl | Herculase®Enhanced DNA Polymerase, Endkonzentration: 1 Unit         |

Dazu wurden entweder 3 µl der cDNA oder 3 µl Wasser (als Kontrolle) pipettiert. Die beiden Ansätze wurden dann im Thermocycler- wie unter 4.5.1.3. beschrieben - temperiert und am Ende wieder abgekühlt.

#### 4.5.1.3. Herculase-PCR-Protokoll

1. 95 °C 2 Min.
  2. 95 °C 30 Sek.
  3. 60 °C 30 Sek.
  4. 72 °C 2 Min.
  5. 72 °C 10 Min.
  6. 4 °C Pause
- } 34 Mal wiederholt

#### 4.5.2. Hot-FIRE-Polymerase (HFP)-PCR

##### 4.5.2.1. Material

Hot FIREPol®DNA Polymerase <sup>16</sup>

10 x reaction puffer B (Mg<sup>2+</sup> free) <sup>16</sup>

Wasser <sup>1</sup>

dNTP Mix <sup>19</sup>

MgCl<sub>2</sub> (25 mM) <sup>16</sup>

Primer 100 pmol/µl <sup>9</sup>

| Primerbezeichnung mit Orientierung ( ) | Sequenz                    | Enzymschnittstelle | Temperatur (°C) |
|--|----------------------------|--------------------|-----------------|
| 742 (sense)                            | CTTGAGAGTGCAGCGGTGCGA      |                    | 60              |
| 1253 (sense)                           | GAATTCCTGCCCCGACCCTCCCTG   | EcoRI              | 60              |
| 1254 (antisense)                       | GAATTCTGCAGGTGTGGGTGTCAC   | EcoRI              | 60              |
| 1266 (sense)                           | ATGAATTCCTGCCCCGACCCTCCCTG | EcoRI              | 60              |
| 1267 (antisense)                       | ATGAATTCTGCAGGTGTGGGTGTCAC | EcoRI              | 60              |

**Tabelle 2: Auflistung der in der HFP-PCR verwendeten Primer**

#### 4.5.2.2. Durchführung

Für einen einfachen Ansatz wurden folgende Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge gemischt:

|     |    |   |
|-----|----|---|
| 4,6 | µl | Wasser  |
| 1,2 | µl | MgCl <sub>2</sub> 25 mM, Endkonzentration: 2,5 mM                   |
| 1,5 | µl | Puffer B  |
| 1,5 | µl | dNTP Mix 2,0 mM, Endkonzentration: 0,2 mM                           |
| 3,0 | µl | Sense-Primer, 1:100 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 20 mM     |
| 3,0 | µl | Antisense-Primer, 1:100 in Wasser verdünnt, Endkonzentration: 20 mM |
| 0,2 | µl | Hot FIREPol®DNA Polymerase, Endkonzentration: 1 Unit                |

Für mehr als einen Ansatz wurde aus den oben beschriebenen Reagenzien ein Mastermix mit 10 % Überschuss in einem Cup angelegt und aus diesem Mastermix dann je 15 µl in die entsprechend nummerierten Cups pipettiert.

Hierauf wurde in den als „**Bakterien-PCR**“ und „**Bakterien-Richtungs-PCR**“ bezeichneten Methoden je eine Bakterienkolonie als Matrize mit je einer Pipettenspitze in das entsprechend nummerierte Cup gebracht. Nur in die Negativkontrolle wurde keine Bakterienkolonie eingebracht. Die PCR erfolgte nach den unten beschriebenen Kriterien im Thermocycler. Bei der als „**Bakterien-Richtungs-PCR**“ bezeichneten Methode wird ein Primer verwendet, der außerhalb des Inserts auf dem Vektor liegt. Somit können anhand der Banden in der Agarosegelelektrophorese Kolonien identifiziert werden, die ein Insert besitzen, das richtig orientiert ist.

#### 4.5.2.3. HFP-PCR-Protokoll

1. 96 °C 15 Min. 30 Sek.
2. 96 °C 30 Sek.
3. 60 °C 30 Sek. } 34 Mal wiederholt
4. 72 °C 2 Min. }
5. 72 °C 10 Min.
6. 4 °C Pause

#### 4.6. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zum Auftrennen von DNA- und RNA-Gemischen entsprechend ihrer Länge. Nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid können die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden und für eine eventuelle weitere Verwendung ausgeschnitten werden.

##### 4.6.1. Material

###### 5 x TBE Puffer

- 54,0 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan <sup>1</sup>
- 27,5 g Borsäure <sup>1</sup>
- 20,0 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) s.unten
- Ad 1000 ml Aqua dest., bei RT lagern

###### 0,5 x TBE

- 100 ml 5 x TBE (s. oben)
- Ad 1000 ml Aqua dest.

###### EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

- 700 ml Aqua dest.
- 186,1 g EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2 H_2O$ ) <sup>1</sup>
- 20,0 g Natriumhydroxid (NaOH) <sup>8</sup>
- pH 8,0 mit NaOH <sup>1</sup> einstellen
- Ad 1000 ml Aqua dest., bei RT lagern

**1%ige Agarose**

1 g Agarose <sup>12</sup>  
100 ml 0,5 x TBE-Puffer

**0,75%ige Agarose**

0,75 g Agarose <sup>12</sup>  
100 ml 0,5 x TBE-Puffer

**6 x Loading Dye Solution <sup>19</sup>****Gene Ruler™DNA Ladder Mix <sup>19</sup>****2 x Loading dye Solution (for RNA electrophoresis) <sup>19</sup>****Stammlösung Ethidiumbromid**

10 mg Ethidiumbromid <sup>15</sup>

Ad 1 ml Aqua dest., bei 4 °C aufbewahren

Ethidiumbromidbad: 1:5000-Verdünnung der Stammlösung in Aqua dest.

**4.6.2. Durchführung**

Nach Auswahl der für die Anzahl der Proben geeigneten Gelkammer und der entsprechenden Probentaschenkämme wurde die 1%ige bzw. 0,75%ige Agarose durch Erhitzen in der Mikrowelle verflüssigt, kurz bis auf 50 °C abkühlen lassen und luftblasenfrei in die Gelkammer samt Probentaschenkämme gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Kämme gezogen und das Gel in der Gelkammer mit 0,5 x TBE überschichtet.

Je nach Bedarf wurde entweder das gesamte PCR-Produkt mit so viel ml an 6 x loading dye vermischt, dass der 6 x loading dye am Ende nur 1 x konzentriert war oder es wurden nur 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl 6 x loading dye vermischt und dieses Gemisch wurde dann in die Taschen des Gels aufgetragen. Der Ladepuffer enthält 2 Farbstoffe, Bromophenolblau und Xylen Cyanol FF. Mithilfe dieser beiden Farbstoffe kann man makroskopisch die Wanderung der DNA verfolgen, da bei z.B. 1%igen Agarosegelen Bromophenolblau mit ca. 300 bp-langer DNA zusammen wandert, währenddessen Xylene Cyanol FF mit ca. 4000 bp-langer DNA wandert. Zusätzlich beschwert der Ladepuffer die PCR-Produkt-Probe. Als Marker für die Länge der PCR-Produkte nach dem Auftrennen wurde 2 µl Gene Ruler™DNA Ladder Mix in eine Geltasche pipettiert. Je nach Größe des Gels wurde eine konstante Spannung

von 120 V (kleine Gele) bis 150 V (große Gele) angelegt. Nach ausreichender Auftrennung der Proben wurde das Gel 30 Min. in einem Ethidiumbromidbad unter Schwenken gefärbt. Anschließend wurden die aufgetrennten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht, eventuell ausgeschnitten und das Gel fotografiert.

Bei Gelen für die Beurteilung der RNA konnte die Inkubation des Gels im Ethidiumbromidbad unterbleiben, da der für die RNA-Proben verwendete 2 x loading dye bereits Ethidiumbromid enthält.

## 4.7. Gelaufreinigung

### 4.7.1. Material

**Sterile Skalpellklinge**<sup>5</sup>

**DNA Isolation Spin Kit**<sup>1</sup>

**Tris-HCl-Lösung (0,5 M, pH 8,0)**

80 ml Aqua dest.

6,057 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan<sup>1</sup>

pH mit HCl<sup>1</sup> auf 8,0 einstellen

ad 100 ml Aqua dest., bei RT lagern

**TE-Puffer**

1 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0) s. oben

0,10 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) s. 4.6.1.

Ad 50 ml Aqua dest.

### 4.7.2. Durchführung

Um mit einem DNA-Fragment einer bestimmten Länge, das über die Gelelektrophorese aufgetrennt worden ist, weiter arbeiten zu können musste dieses aus dem Gel ausgeschnitten werden und aufgereinigt werden. Hierzu wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und mit Hilfe des DNA Isolation Spin Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch bestimmt.



## 4.8. Restriktionsenzymverdau

Der Restriktionsenzymverdau dient dazu, DNA an bestimmten Stellen durch das Restriktionsenzym schneiden zu lassen. Im Fall des Restriktionsenzym EcoRI handelt es sich bei dieser bestimmten Stelle um das Palindrom GAATTC. Als Palindrom wird in der Genetik eine kurze doppelsträngige DNA-Sequenz bezeichnet, die in beiden Strängen aus einer Richtung aus betrachtet (z.B. immer aus der 5´-3´Richtung) die gleiche Basenabfolge hat. EcoRI schneidet diese Sequenz in beiden Strängen jeweils zwischen G und A und erzeugt so sogenannte „sticky ends“/klebrige Enden. In dieser Arbeit wurde der Restriktionsenzymverdau mit EcoRI vor allem dazu verwendet, um ein bestimmtes DNA-Stück aus einem Plasmid auszuschneiden und dieses ausgeschnittene DNA-Stück in einen anderen Vektor, der auch EcoRI-Schnittstellen besaß, zu ligieren.

### 4.8.1. Material

**EcoRI** <sup>19</sup>

**Buffer EcoRI** <sup>19</sup>

**Wasser** <sup>1</sup>

### 4.8.2. Durchführung

|   |    |              |
|---|----|--------------|
| 2 | µl | Buffer EcoRI |
| 1 | µl | EcoRI        |
| 5 | µg | Plasmid      |

Mit Wasser ad 20 µl Gesamtvolumen

Aufgrund der relativ großen DNA-Menge wurde der Ansatz 12 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert, um die DNA vollständig schneiden zu lassen. Danach folgte eine Erhöhung der Temperatur auf 65 °C für 20 Min., um das Enzym zu inaktivieren. Als letzter Schritt im Thermocycler wurde die Temperatur auf 4 °C gesenkt. Danach erfolgte eine Agarosegelelektrophorese und die Gelaufreinigung der Bande der gewünschten Länge.

## 4.9. SAP-Verdau

Der Verdau mit dem Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) dient der Entfernung der Phosphatreste an beiden 5'-Enden der DNA, um eine Selbstligation eines Vektors, aus dem das Insert mittels RE-Verdau herausgeschnitten wurde, zu verhindern. In dieser Arbeit wurde der SAP-Verdau bei der Herstellung des Zeta-Vektors (s. 4.11.) nach dem EcoRI-Verdau und der Gelaufreinigung verwendet.

### 4.9.1. Material

#### Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) <sup>19</sup>

#### 10 x Buffer for SAP <sup>19</sup>

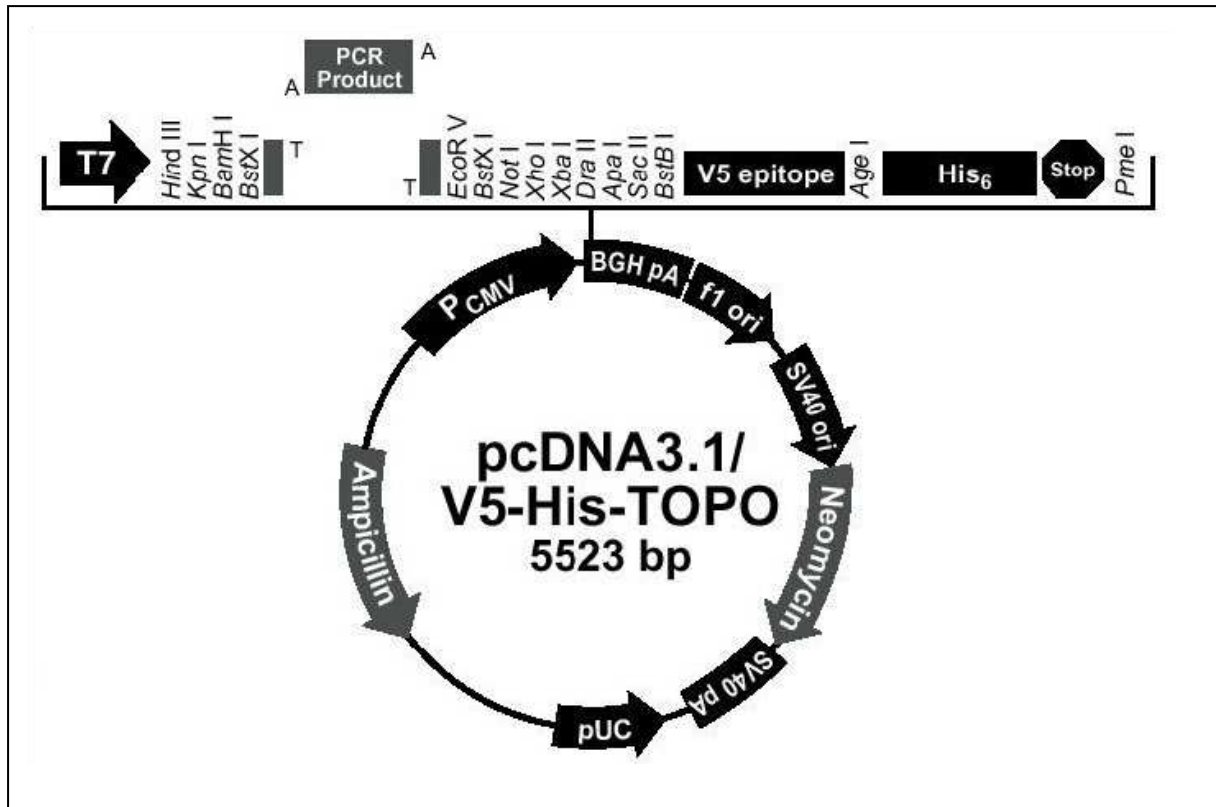
### 4.9.2. Durchführung

|     |    |                                 |
|-----|----|---------------------------------|
| 30  | µl | Produkt aus der Gelaufreinigung |
| 3,4 | µl | 10 x Buffer for SAP             |
| 1   | µl | SAP                             |

Der Ansatz wurde 30 Min. bei 37 °C und daran anschließend 20 Min. bei 65 °C (dieser Schritt dient der Inaktivierung des Enzyms) im Thermocycler inkubiert.

## 4.10. TA-Klonierung

Das pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®TA Expression Kit liefert eine effiziente Methode, um PCR-Produkte in einen Vektor zu klonieren. Da der in diesem Kit vorhandene Vektor 3'-Thymidin-Überhänge besitzt ist die Voraussetzung, um diese Methode nutzen zu können, dass das zu inserierende PCR-Produkt 3'-A-Überhänge besitzt. Diese 3'-A-Überhänge werden von der Taq-Polymerase ohne Template-Vorgabe während der PCR an das PCR-Produkt geheftet. Durch die Topoisomerase I aus dem Vacciniavirus werden die A-Überhänge am 3'-Ende des PCR-Produkts mit den T-Überhängen des Vektors verbunden. Der Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO® ist in Abbildung 6 dargestellt. Nach der Klonierung erfolgt die Transformation von chemisch kompetenten E. coli.



**Abbildung 6: pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor**

Die Multiple Cloning Site ist extrahiert dargestellt. In dieser kann man die 3'-T-Überhänge des Vektors erkennen. Die 3'-A-Überhänge sind an dem PCR-Produkt zu sehen.

#### 4.10.1. Material

##### pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO®TA Expression Kit <sup>6</sup>

#### 4.10.2. Durchführung

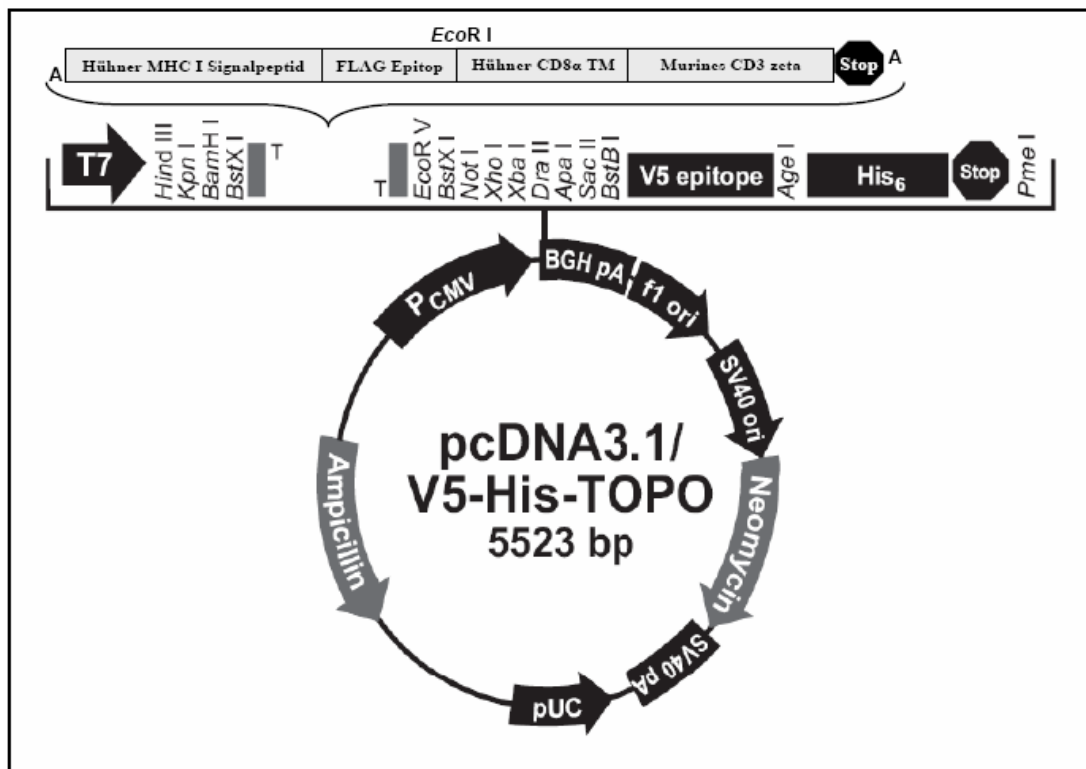
Die Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers, d.h. 4 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl salt solution und 1 µl pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor vermischt, 5 Min. bei RT stehen gelassen und danach 1 Min. auf Eis gestellt. Das PCR-Produkt wurde in dieser Arbeit aber nicht mit der Taq-Polymerase generiert, sondern mittels der Herculase®Enhanced DNA Polymerase. Diese besteht aus einer Mischung von 2 verschiedenen Polymerasen, der Pfu-DNA-Polymerase und der Taq2000™-DNA-Polymerase. Wie oben erwähnt ist die Taq-Polymerase essentiell für das Anhängen der 3'-A-Überhänge an das PCR-Produkt.

Nach der Klonierung erfolgte die Transformation von One Shot®TOP10 chemisch kompetenten E. coli mit den Plasmiden ebenfalls nach Herstellerangaben und das

Ausplattieren der gesamten Transformation auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsantibiotikum (s. 4.12.).

#### 4.11. Ligation

Zur Erstellung der **CHIR-Konstrukte** wurde der Zeta-Vektor mit den entsprechenden, EcoRI geschnittenen und aufgereinigten, Inserts ligiert. Der Zeta-Vektor ist ein im Institut durch Frau Dr. Birgit Viertlböck hergestellter, veränderter pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor, der ein Hühner-MHC-Signalpeptid, ein Flag-Epitop, die transmembrane Domäne des CD8α-Moleküls des Huhns und die intrazelluläre Domäne des CD3-zeta-Moleküls der Maus enthält und zwischen dem Flag-Epitop und der transmembranen Domäne des CD8α-Moleküls eine EcoRI-Schnittstelle besitzt. So ermöglicht diese EcoRI-Schnittstelle nach Restriktionsenzymverdau des Vektors, SAP-Verdau und Gelaufreinigung die Ligation mit EcoRI verdauten und aufgereinigten Inserts. In der Abbildung 7 ist der Zeta-Vektor dargestellt.



**Abbildung 7: Zeta-Vektor**

Der Zeta-Vektor ist ein modifizierter pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor, der ein Hühner-MHC-Signalpeptid, ein Flag-Epitop, die transmembrane Domäne des CD8α-Moleküls des Huhns und die intrazelluläre Domäne des CD3-zeta-Moleküls der Maus enthält und zwischen dem Flag-Epitop und der transmembranen Domäne des CD8α-Moleküls eine EcoRI-Schnittstelle besitzt.

#### 4.11.1. Material

##### **Zeta-Vektor**

##### **Rapid DNA Ligation Kit** <sup>19</sup>

#### 4.11.2. Durchführung

50 ng Vektor, das Insert (dreifache Molmenge des Vektors), 4 µl 5 x Rapid Ligation Buffer, 1 µl T4 DNA Ligase wurden in ein 1,5 ml Cup pipettiert und der Ansatz mit nucleasefreiem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 4 µl der Ligation für die Transformation von chemisch kompetenten TOP10 E. coli verwendet und der Rest bei -20 °C gelagert.

### **4.12. Transformation von chemokompetenten TOP10 E. coli**

#### 4.12.1. Material

##### **Chemisch kompetente TOP10 E. coli** <sup>6</sup>

##### **SOC-Medium** <sup>6</sup>

##### **LB-Agar**

40 g LB-Agar-Powder <sup>1</sup>

Ad 1000 ml Aqua dest., autoklaviert, bei 4 °C gelagert

##### **Ampicillin 100 µg/µl**

100 mg Ampicillin-Natriumsalz <sup>1</sup>

Ad 1 ml Aqua bidest., aliquotiert à 100 µl, bei -20 °C gelagert

#### 4.12.2. Durchführung

2 µl des Produktes einer TA-Klonierung oder 4 µl einer Ligation wurden zu den chemisch kompetenten TOP10 E. coli gegeben und sanft gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation mittels Hitzeschock, bei dem der Ansatz für 30 Sek. in 42 °C warmes Wasser gehalten wurde. Nach diesen 30 Sek. wurde der Ansatz sofort für 1 Min. auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde die Transformation für 1 h bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt. Anschließend folgte das Ausplattieren der transformierten Bakterien auf vorgewärmte (37 °C) LB-Amp-Platten (= LB-Agar-Platte mit 100 µg/ml Ampicillin als

Selektionsantibiotikum). Diese Platten wurden 18 h bei 37 °C bebrütet. Die entstandenen Kolonien wurden am nächsten Tag durch Bakterien-PCR (s. 4.5.2.2.) auf das Vorhandensein eines Plasmids mit einem enthaltenen Insert getestet. Positive Kolonien wurden dann der Plasmidaufreinigung (s. 4.13.) unterzogen und das aufgereinigte Plasmid wurde zur Sequenzanalyse (s. 4.15.) zu GATC geschickt.

### 4.13. Plasmidaufreinigung

Die Plasmidaufreinigung wurde dazu verwendet, um Plasmide aus zuvor transformierten Bakterien wieder aufzureinigen. Als Plasmidaufreinigungsverfahren wurde entweder der sogenannte „MiniPrep“ oder der sogenannte „MidiPrep“ verwendet. Die Plasmidausbeute ist beim „MidiPrep“ höher als beim „MiniPrep“.

#### 4.13.1. Mini-Prep

##### 4.13.1.1. Material

###### LB-Medium

25 g LB-Pulvermedium<sup>1</sup>

Ad 1 l Aqua dest., autoklaviert und bei 4 °C gelagert

**Ampicillin 100 µg/µl s. 4.12.1.**

**PP-Tube 12 ml Sterile<sup>4</sup>**

**NucleoSpin®Plasmid-Kit<sup>7</sup>**

##### 4.13.1.2. Durchführung

Über Nacht wurde die Bakterienkolonie, aus der das Plasmid aufgereinigt werden sollte, in 5 ml flüssigem **LB-Amp-Medium** (= **LB-Medium mit 100 µg Ampicillin pro ml**) zur Vermehrung 16 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt (sogenannte „Nachtkultur“).

Am nächsten Tag wurden die Bakterien von 4 ml der Bakterien-LB-Amp-Suspension durch 2-malige Zentrifugation (30 Sek. bei 11000 x g) von je 2 ml in einem 2 ml-Cup pelletiert und der Überstand verworfen. Hierauf folgte die Resuspension der Bakterien durch Zugabe von 250 µl „Resuspension Buffer“ und Vortexen und die Lyse der Zellen durch die Zugabe von 250 µl „Lysis Buffer“ und einer Einwirkzeit dieses von max. 5 Minuten bei RT nach vorherigem vorsichtigem Mischen. Zur Abstopfung der Lyse wurde nach 5 Min. 300 µl „Neutralization buffer“ dazugegeben,

der Ansatz durch Schwenken des Cups wiederum gut gemischt und zur Reinigung des Lysates der Ansatz für 10 Min. bei 11000 x g zentrifugiert. Zur Bindung der Plasmid-DNA an die Silicamembran der NucleoSpin®Plasmid Säule wurden die 800 µl des gereinigten Lysates in die NucleoSpin®Plasmid Säule, welche zuvor in ein NucleoSpin®Collecting Tube gesteckt worden war, übertragen und 1 Min. bei 11000 x g zentrifugiert. Beim Übertragen wurde sehr genau darauf geachtet, dass kein an der Wand des 2 ml-Cups sich befindlicher Zelldebris in die NucleoSpin®Plasmid Säule übertragen wurde, sondern nur das klare, gereinigte Lysat. Nach der Zentrifugation wurde der Durchlauf verworfen und die Silicamembran durch Zugabe von 500 µl - auf 50 °C vorgewärmten - „AW-Puffer“ und 1-minütiger Zentrifugation bei 11000 x g gewaschen. Nach Verwerfen des Durchlaufs erfolgte ein zweiter Waschschrift, aber diesmal mittels 600 µl „Wash Buffer“. Der Durchlauf wurde nach der Zentrifugation verworfen und die Silicamembran durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 11000 x g getrocknet. Danach wurde die NucleoSpin®Plasmid Säule in ein neues 1,5 ml-Cup umgesetzt und die Plasmid-DNA aus der Silicamembran der NucleoSpin®Plasmid Säule durch 50 µl „Elution Buffer“ mittels 1-minütiger Inkubation bei RT und darauf folgender 1-minütiger Zentrifugation bei 11000 x g eluiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde im Photometer bestimmt. Je nach aufgereinigtem Plasmid wurde die Plasmid-DNA z.B. entweder zu GATC zum Sequenzieren geschickt oder ein Restriktionsenzymverdau gemacht, um das Insert aus dem Vektor heraus zu schneiden.

#### 4.13.2. MidiPrep

##### 4.13.2.1. Material

**LB-Medium (s. 4.13.1.1)**

**Ampicillin 100 µg/µl (s. 4.12.1.)**

**PP-Tube 12 ml Sterile <sup>4</sup>**

**Nucleobond®PC100-Kit <sup>7</sup>**

**70%iger Alkohol**

7 ml Ethanol absolut reinst Ph. Eur.USP <sup>1</sup>

3 ml Aqua bidest.

**TE-Puffer s. 4.7.1.**

#### 4.13.2.2. Durchführung

Der „MidiPrep“ wurde als Kombination von 3 aufeinander folgenden Schritten durchgeführt: 1. einer „Tagkultur“, 2. einer „Nachtkultur“ und 3. der Plasmidaufreinigung mittels des Nucleobond®PC-Kits. Bei der Tagkultur wurden 2 ml flüssiges LB-Amp-Medium (s. 4.13.1.2.) in ein PP-Tube pipettiert und eine Einzelkolonie in das LB-Amp-Medium gegeben. Der Ansatz wurde dann 3 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Für die Nachtkultur wurden 50 ml flüssiges LB-Amp-Medium in einen autoklavierten Erlenmeyerkolben gegeben, die 2 ml der Tagkultur in diese 50 ml gegeben und der Erlenmeyerkolben 16 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Am folgenden Tag erfolgte die Plasmidaufreinigung nach Angaben des Herstellers mittels des Nucleobond®PC-Kits. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 4.14. Anlegen von Bakterienstocks

#### 4.14.1. Material

**Kryovials** <sup>14</sup>

**Autoklavierte Spitzen**

**Glycerin**

100 ml Glycerin wasserfrei für die Molekularbiologie <sup>1</sup>

Autoklaviert, bei RT gelagert

#### 4.14.2. Durchführung

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienkolonien wurde von diesen ein Bakterienstock angelegt. Dazu wurden 850 µl der entsprechenden Nachtkultur für einen MiniPrep (s. 4.13.1.2.) zu 150 µl Glycerin in ein Kryovial gegeben. Der Inhalt des Röhrchens wurde gut gemischt und das Kryovial wurde bei minus 80 °C gelagert.

### 4.15. DNA-Sequenzierung

Plasmide wurden durch die Firma GATC (GATC Biotech AG, Jakob-Stadler-Platz 7, D-78467 Konstanz) sequenziert. Entsprechend der Vorgaben von GATC wurden die zu sequenzierenden Plasmide in einer Konzentration von 100 ng/µl in 30 µl Aqua



bidest. verschickt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mittels der Software DNASTar Lasergene (s. 4.20.1.).

## 4.16. Transfektion von eukaryotischen Zellen

### 4.16.1. Transiente Transfektion von 293T-Zellen

Die transiente Transfektion von 293T-Zellen wurde für die Expressionskontrolle der CHIR-Konstrukte verwendet. Die transiente Transfektion erfolgte in dieser Dissertation durch Metafectene™, welches ein liposomales Transfektionsreagenz ist.

#### 4.16.1.1. Material

##### RPMI 1640<sup>6</sup>

Bei 4 °C aufbewahrt

##### Metafectene™<sup>3</sup>

Bei 4 °C aufbewahrt

##### Standardmedium

445 ml RPMI 1640<sup>6</sup>

50 ml FCS<sup>2</sup>

5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Endkonzentration: 100 I.E./ml  
Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)<sup>2</sup>

Bei 4 °C aufbewahrt

#### 4.16.1.2. Durchführung

4,3 x 10<sup>5</sup> Zellen wurden in 500 µl Standardmedium in einer Delle einer 24-LP für 4 h adhären gelassen. Metafectene™, RPMI 1640 und das zu transfizierende Plasmid wurden auf RT gebracht. In einem 0,5 ml-Cup wurden 0,7 µg Plasmid in gesamt 30 µl RPMI 1640 pipettiert. In einem zweiten 0,5 ml-Cup wurden 27,5 ml RPMI 1640 vorgelegt und 2,5 µl Metafectene™ dazugegeben. Die Plasmid- RPMI 1640-Mischung wurde in das Röhrchen der Metafectene™-RPMI 1640-Mischung gegeben und der Ansatz wurde 15 Min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz tropfenweise auf die 293T-Zellen pipettiert, wobei die 24-LP kontinuierlich leicht hin und her bewegt wurde, um eine gute Verteilung zu erhalten. Die 24-LP wurde danach 24 h bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen in der Durchflusszytometrie getestet (s. 4.19.).

#### 4.16.2. Stabile Transfektion von BWZ.36-Zellen

Die stabile Transfektion von BWZ.36-Zellen wurde für die Generierung der stabilen Zelllinien, die für die Ligandensuche dienen sollten, verwendet. Sie erfolgte mit Hilfe der Elektroporation, einer Methode bei der die Zellmembran durch das kurzzeitige Anlegen eines Stroms permeabilisiert wird.

##### 4.16.2.1. Material

###### **Elektroporationsküvette, 4 mm Elektrodenabstand <sup>12</sup>**

**1 x PBS (s. 4.2.1.)**

###### **PBS-EDTA**

200 mg EDTA-Tetranatriumsalz-Dihydrat <sup>1</sup>  
(C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O)

Ad 1000 ml 1 x PBS; autoklaviert und bei 4 °C gelagert

###### **Stammlösung G418 (50 mg G418/ml) <sup>2</sup>**

500 mg G418

Ad 10 ml RPMI 1640; 0,22 µm steril filtriert (0,22 µm Filter <sup>14</sup>), bei 4 °C gelagert

###### **Standardmedium (s. 4.16.1.1.)**

###### **Selektionsmedium**

20 ml Standardmedium s. 4.16.1.1.

320 µl Stammlösung G418 s. oben

Endkonzentration: 800 µg G418/ml

**25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche <sup>11</sup> oder <sup>14</sup>**

**Sterile 96-Loch Flachlochplatte <sup>11</sup> oder <sup>14</sup>**

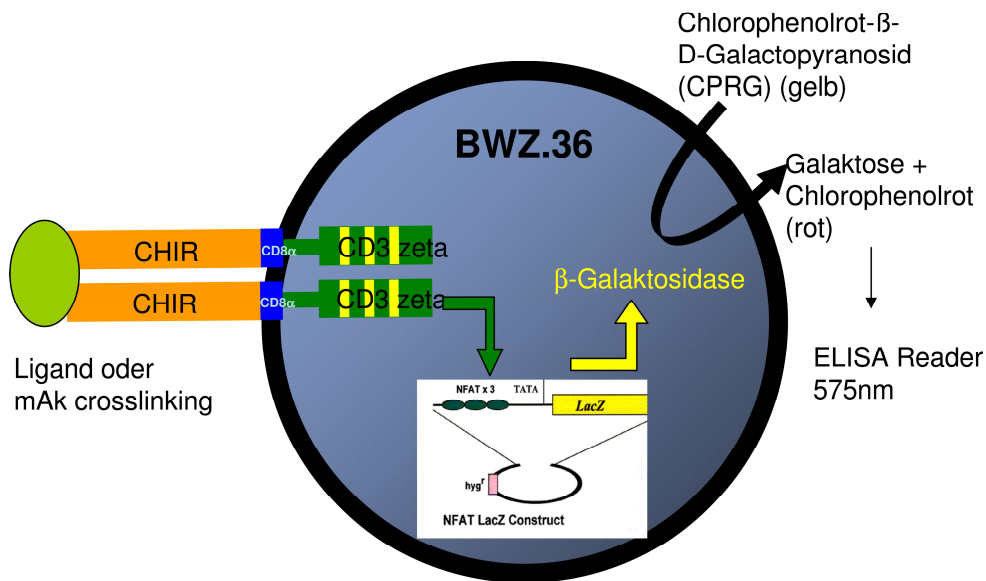
##### 4.16.2.2. Durchführung

Pro Elektroporationsansatz wurden 3 x 10<sup>6</sup> Zellen in einem 50 ml-Falcon einmal mit 20 ml PBS gewaschen, in 400 µl PBS aufgenommen, 25 µg Plasmid-DNA dazugegeben und in eine Elektroporationsküvette überführt. Der Ansatz wurde dann 10 Min. auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden am Elektroporator die Einstellungen für die Elektroporation vorgenommen. Die Kapazität wurde auf 950 µF,

die Spannung auf 200 V eingestellt. Nach der 10-minütigen Inkubation wurden die Kontakte der Elektroporationsküvette abgetrocknet und diese in den Schlitten des Elektroporators eingelegt. Die Elektroporationszeiten lagen zwischen 30 und 60 mSek.. Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in der Küvette 5 Min. auf Eis gekühlt. Daraufhin wurden die elektroporierten Zellen komplett in eine kleine Zellkulturflasche mit 10 ml Standardmedium überführt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Ablösung mit 5 ml PBS-EDTA und einem Waschschrift mit PBS in 20 ml Selektionsmedium aufgenommen und diese 20 ml auf einer sterilen 96-Loch Flachlochplatte mit 200 µl/Delle ausplattiert. Erste Klone waren nach etwa 2 Wochen sichtbar und wurden in der Durchflusszytometrie (s. 4.19.) getestet.

#### **4.17.     β-Galactosidase-Assay mit BWZ.36-Zellen**

Der β-Galactosidase-Assay wurde in der vorliegenden Dissertation dazu verwendet, stabil mit CHIR-Konstrukten (s. 4.11.) transfizierte Zelllinien auf ihre Funktionalität bezüglich der Verknüpfung des extrazellulären Teils der transfizierten Rezeptoren mit der intrazellulären Signalkaskade zu testen. Dieser Test diente somit gleichzeitig als Test für die Eignung der Zelllinien für die Ligandensuche. In den BWZ.36-Zellen, die stabil transfiziert sind für das Gen der β-Galactosidase (LacZ-Gen) [41], steht das LacZ-Gen unter dem NFAT-Promotor. Nach der Aktivierung des Promotors wird das Enzym β-Galactosidase produziert. Diese kann nach Umsetzung eines Substrats (CPRG, Chlorophenolrot-β-D-Galactopyranosid (gelb) durch das Enzym zu Galaktose und Chlorophenolrot (rot) gespalten) durch einen Farbumschlag im Photometer nachgewiesen werden (s. Abbildung 8). Die Aktivierung des NFAT-Promotors erfolgte in den stabil mit CHIR-Konstrukten transfizierten Zelllinien durch das intrazytoplasmatische CD3-zeta-Molekül (s. Abbildung 8) nach Kreuzvernetzung des Rezeptors. Die Kreuzvernetzung der stabil transfizierten Rezeptoren konnte durch einen Anti-Flag-Antikörper erreicht werden, da die CHIR-Konstrukte ein FLAG-Epitop besitzen (s. Abbildung 7). Es wurde in Triplets gearbeitet. So wurden pro Zelllinie 3 Dellen für die Negativkontrolle, bei der keine Stimulierung der Zellen stattfand, 3 Dellen für den eigentlich Test der Funktionalität durch spezifische Stimulierung mittels eines Anti-Flag-Antikörpers und 3 Dellen für die Positivkontrolle, die in einer unspezifischen Aktivierung der Zellen durch PMA/Ca-Ionophor bestand, verwendet.



**Abbildung 8: Schema des β-Galactosidase-Assays**

BWZ.36-Zellen enthalten stabil das Gen für die β-Galactosidase („LacZ“-Gen). Dieses Enzym setzt CPRG zu Galaktose und Chlorophenolrot um. Der Farbumschlag kann im Photometer bei 575 nm gemessen werden. Das LacZ-Gen steht unter der Regulation des NFAT-Promotors. Dieser wird über die Signalkaskade, die im Zusammenhang mit CD3-zeta abläuft, aktiviert. Um diese Signalkaskade und diesen Promotor nutzen zu können befinden sich die CHIRs im Verbund mit diesem CD3-zeta.

#### 4.17.1. Material

##### High sensitivity β-Galactosidase Kit <sup>18</sup>

##### 1 x CPRG

1 ml 25 x CPRG <sup>18</sup>  
 24 ml Puffer A <sup>18</sup>

Kurz vor Gebrauch ansetzen

##### 1 x PBS (s. 4.2.1.)

##### Standardmedium (s. 4.16.1.1.)

##### Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody <sup>15</sup>, auf 10 µg/ml in PBS verdünnt

##### Stammlösung PMA (1 mg/ ml)

1 mg Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) <sup>15</sup>

Ad 1 ml DMSO <sup>1</sup>, in Aliquots von 20 µl bei -20 °C gelagert

**Stammlösung Ca-Ionophor (1 mg/ml)**

1 mg Calcium ionophore III<sup>15</sup>

Ad 1 ml DMSO<sup>1</sup>, in Aliquots von 100 µl bei -20 °C lagern

**Sterile 96-Loch Flachlochplatte<sup>11</sup> oder<sup>14</sup>****Unsterile 96-Loch Flachlochplatte<sup>14</sup>****Klebefolie<sup>14</sup>****4.17.2. Durchführung**

Als erstes wurden die Dellen einer 96-Loch Flachlochplatte, die der Stimulierung der Zellen durch Bindung des stabil transfizierten Rezeptors an einen Anti-Flag-Antikörper dienen sollten, mit 50 µl des Anti-Flag-Antikörpers mit einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtet. Dieser wurde 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> adhären lassen und nach 4 h wurden diese Dellen 3 Mal mit 100 µl PBS gewaschen, um nicht an die Platte gebundenen Antikörper zu entfernen. 6 x 10<sup>4</sup> Zellen wurde pro Delle in 100 µl Standardmedium gesät. Die 3 Dellen der Negativkontrolle und die 3 Dellen der Anti-Flag-Stimulierung wurden mit jeweils 100 µl Standardmedium auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Die 3 Dellen der Positivkontrolle wurden mit 100 µl Standardmedium, in welches PMA/Ca-Ionophor in einer Konzentration von 20 ng PMA und 1 µg Ca-Ionophor pro ml Medium gegeben worden war, auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. So betrug die PMA/Ca-Ionophor-Konzentration in den Positivkontrollen 10 ng PMA und 0,5 µg Ca-Ionophor pro ml Medium. Die Platte wurde 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Am nächsten Tag wurde der gesamte Überstand aus jeder Delle vorsichtig abgenommen und verworfen und 20 µl Lysepuffer in jede Delle pipettiert. Zur Sicherstellung der vollständigen Lyse der Zellen wurde die Platte 30 Min. bei -20 °C in den Gefrierschrank gestellt und danach 10 Min. bei RT auftauen lassen. Dieser Einfrier-Auftau-Schritt wurde ein 2. Mal wiederholt und danach pro Delle 130 µl 1 x CPRG hinzupipettiert. Die 150 µl-Gesamtvolumen pro Delle wurden in eine unsterile 96-Loch Flachlochplatte übertragen, diese mit einer Klebefolie abgedeckt und bei 37 °C inkubiert. Nach 10 Min., 2 h und 18 h wurde die β-Galactosidase-Produktion anhand des entstandenen Chlorophenolrots im Plattenphotometer bei 575 nm gemessen.

## 4.18. Kultivierung von Zellen

### 4.18.1. Material

25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen <sup>11</sup> oder <sup>14</sup>

75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen <sup>11</sup> oder <sup>14</sup>

175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen <sup>11</sup>

24-Lochplatten (steril) <sup>11</sup>

6-Lochplatten (steril) <sup>11</sup>

96- Loch Flachlochplatten (steril) <sup>11</sup> oder <sup>14</sup>

RPMI 1640 <sup>6</sup>

Standardmedium (s. 4.16.1.1.)

Selektionsmedium (s. 4.16.2.1.)

1 x PBS (s. 4.2.1.)

PBS-EDTA (s. 4.16.2.1.)

Stammlösung G418 (50 mg G418/ml) (s. 4.16.2.1.)

Trypanblau <sup>2</sup>

Bei RT gelagert

**Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO)**

9 ml FCS

1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) <sup>1</sup>

Bei -20 °C gelagert

Kryoröhrchen <sup>14</sup>

#### 4.18.2. Zelllinien

| Zelllinie | Spezies | Zellart             | Wachstum | Kulturmedium   | Referenz | Verwendung                                       |
|-----------|---------|---------------------|----------|----------------|----------|--|
| 293T      | Mensch  | Nieren-fibroblasten | Adhärenz | Standardmedium | [42]     | - Transiente Transfektion                        |
| BWZ.36    | Maus    | Thymozyten          | Adhärenz | Standardmedium | [41]     | - Stabile Transfektion<br>-β-Galactosidase-Assay |

**Tabelle 3: Beschreibung der verwendeten Zelllinien**

In der Tabelle ist für die in dieser Dissertation verwendeten Zelllinien die Ursprungsspezies der Zelllinie, die Art und das Wachstum der Zelllinie, das Kulturmedium, mit welchem die Zellen kultiviert wurden, eine Referenz im Literaturverzeichnis und die Verwendung der jeweiligen Zelllinie angegeben.

#### 4.18.3. Auftauen von Zellen

Da das Auftauen der Zellen schnell erfolgen muss, damit das im Einfriermedium enthaltene DMSO seine bei RT zytotoxische Wirkung nicht entfalten kann, wurden die Zellen in dem Kryoröhrchen, in dem sie eingefroren worden sind, für ungefähr 2 Min. in ein 37 °C warmes Wasserbad gehalten, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen zu sehen war. Der Inhalt des Kryovials wurde unter der sterilen Werkbank in eine 5 ml Pipette aufgesogen und das DMSO wurde mit kaltem RPMI 1640 langsam ausverdünnt. Der Inhalt der 5 ml Pipette wurde in ein 50 ml-Falcon mit 15 ml kaltem RPMI 1640 gegeben und nach 10-minütiger Zentrifugation bei 8 °C und 1200 rpm wurde das Zellpellet in 25 ml des für die jeweilige Zelllinie passenden Kulturmediums gelöst und in eine mittlere Zellkulturflasche gegeben.

#### 4.18.4. Passagieren von Zellen

Das Kulturmedium der adhärenz wachsenden Zellen wurde verworfen und die Zellen mit 5-10 ml warmen PBS gewaschen. Danach wurden 5-10 ml warmes PBS-EDTA zum Ablösen der Zellen auf die Zellen gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die abgelösten Zellen aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml-Falcon übertragen, gezählt und in der gewünschten Konzentration nach einem Waschschrift mit PBS wieder in das Zellkulturgefäß gegeben.

#### 4.18.5. Einfrieren von Zellen

$5 \times 10^6$  Zellen bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden mit warmen PBS einmal gewaschen, in 1,5 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und diese 1,5 ml wurden dann in ein Kryoröhrchen gegeben. Dieses wurde in die kaltgestellte Einfrierbox gegeben und die Einfrierbox wurde samt Kryoröhrchen in  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  g estellt. Die Einfrierbox enthielt in ihrem Rand Isopropanol, welches die Abkühlung des Kryoröhrchens um  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  pro Min. ermöglicht.

### 4.19. Durchflusszytometrie

Anhand der Durchflusszytometrie kann überprüft werden, ob sich Moleküle auf der Zelloberfläche befinden. Mit Hilfe von Antikörpern gegen diese Zelloberflächenmoleküle kann der Teil der Zellen bestimmt werden, der die Moleküle auf der Zelloberfläche trägt. Dies geschieht über die spezifische Messung der Fluoreszenz von Fluorochromen, die an den Antikörper gebunden sind in einem als „FACS“ (fluorescence activated cell scanner) bezeichneten Gerät. In der vorliegenden Dissertation wurden die Fluorochrome FITC (Fluorescein-Iso-Thiocyanat) und PE (Phycoerythrin) verwendet, die an die entsprechenden sekundären Antikörper gebunden waren. Das Prinzip der Durchflusszytometrie liegt in der Streuung von Licht, wenn eine Einzelzelle einen Laserstrahl passiert. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter (FSC)) ist ein Maß für die Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter (SSC)) ein Maß für die Granularität. Diese beiden Parameter geben eine Aussage über die Zellart. Zusätzlich zur Streuung kann auch die Fluoreszenz der einzelnen Zelle gemessen werden. Im FL1-Kanal wird FITC gemessen, im FL2-Kanal PE und im FL3-Kanal Propidiumjodid. Propidiumjodid ist ein DNA-Interkalator, kann aber keine intakte Zellmembran durchdringen. Daher wird dieser Interkalator für die Lebend-Tot-Diskriminierung verwendet.

#### 4.19.1. Material

##### **10%iges Natriumazid**

10 g Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )<sup>1</sup>

Ad 100 ml 1 x PBS, bei RT gelagert



**Fluopuffer**

2,5 g Albumin Fraktion V pH 7,0 (BSA) <sup>1</sup>  
0,25 ml 10%iges NaN<sub>3</sub> s. oben  
Ad 250 ml 1 x PBS, bei 4 °C gelagert

**Primärer Antikörper:**

**Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody <sup>15</sup>, auf 3 µg/ml in Fluo-Puffer verdünnt**

**Sekundäre Antikörper:**

**Goat anti-mouse Ig (H + L) - FITC <sup>17</sup> 1:50 in Fluopuffer verdünnt**

**Goat anti-mouse IgG<sub>3</sub>-PE <sup>17</sup> 1:300 in Fluopuffer verdünnt**

**10 %iges Propidiumjodid**

1800 µl Fluopuffer s.oben  
200 µl Propidiumjodid <sup>15</sup>

**FACSRöhrchen = PP-Röhrchen Natur 1,3 ml <sup>4</sup>****4.19.2. Durchführung**

Die zu testenden Zellen wurden in eine 96-Loch Rundlochplatte überführt und bei 652 x g für 1 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde aufgeschüttelt und 30 µl primärer Antikörper wurde in alle zu testenden Dellen bis auf die Negativkontrolle gegeben. Die Negativkontrolle erhielt 30 µl Fluopuffer. Die Platte wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt 30 Min. auf Eis stehen gelassen, damit der primäre Antikörper binden konnte. Nach diesen 30 Min. wurden 200 µl Fluopuffer in die Dellen pipettiert, die Platte bei 652 x g für 1 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen aufgeschüttelt und 30 µl verdünnter sekundärer Antikörper in jede der Dellen gegeben. Die Platte wurde mit Aluminiumfolie bedeckt 30 Min. auf Eis inkubieren lassen. Nach diesen 30 Min. erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 200 µl Fluopuffer. Die aufgeschüttelten Zellen wurden in 100 µl Fluopuffer resuspendiert und in FACSRöhrchen übertragen. Diese wurden auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt mit Ausnahme der Negativkontrollen, bei der das Gesamtvolumen 400 µl betrug, da anhand dieser die FACS-Einstellungen vorgenommen werden mussten. Als letzter Schritt wurde zur Darstellung der toten Zellen im FACS 10%iges Propidiumjodid in einer Menge von 2,5 µl pro 100 µl in jedes FACS-Röhrchen gegeben.

Die Auswertung der FACS-Ergebnisse erfolgte mit dem Programm „CellQuestPro“.

## **4.20. Computerprogramme**

### **4.20.1. DNASTAR Lasergene Software**

Die Programme SeqBuilder, SeqMan, EditSeq und MegAlign wurden zur Analyse der DNA- und AS-Sequenzen verwendet. Die Version der Programme war jeweils 7.1.0..

### **4.20.2. MEGA4**

Das Programm Mega4, welches im Internet frei verfügbar ist (<http://www.megasoftware.net>), wurde zur Konstruktion phylogenetischer Bäume verwendet.

## 5. Ergebnisse

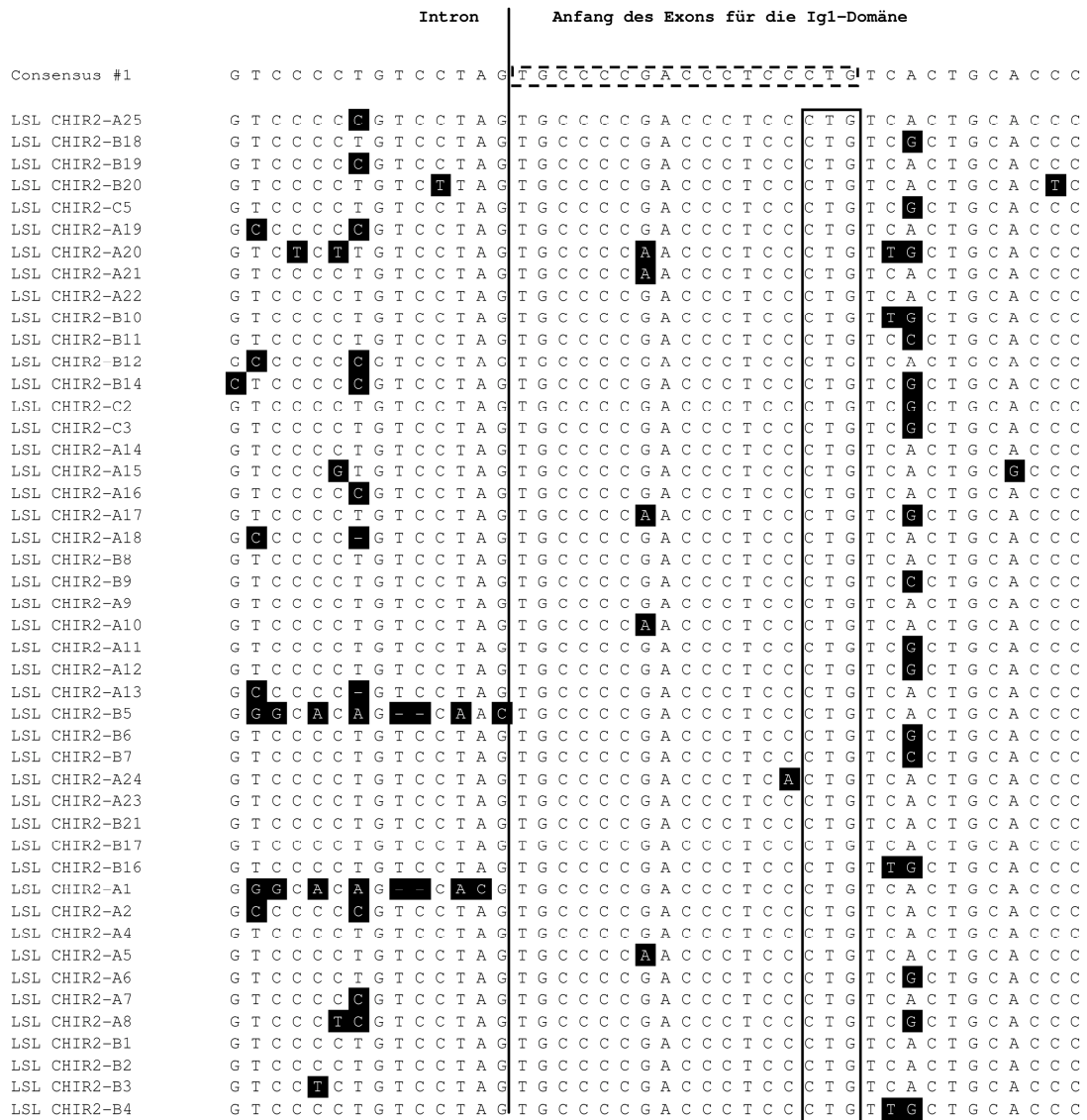
### 5.1. Primer

#### 5.1.1. Design eines geeigneten Primerpaars für die Klonierung von CHIRs mit 2 Ig-Domänen

Die Sequenz des Sense-Primers 1253 (GAATTCCTGCCCCGACCCTCCCTG) und die des Antisense-Primers 1254 (GAATTCTGCAGGTGTGGGTGTCAC) wurden anhand von 46 DNA-Sequenzen von CHIRs (chicken immunoglobulin-like receptors) mit 2 Immunglobulindomänen (Ig-Domänen) festgelegt. Die 46 DNA-Sequenzen wurden von Frau Dr. Viertböck zur Verfügung gestellt. Bei diesen handelt es sich um 46 Sequenzen von 51 vorhandenen aus den BAC (bacterial artificial chromosomes) –Klonen eines LSL (Lohmann selected leghorn) –Huhns (s. Abbildung 4 und 2.2.6.5.).

Da die Primer dazu dienen sollten, die gesamte Ig1- und Ig2-Domäne der CHIRs zu klonieren, sollte der Sense-Primer so gewählt werden, dass er am Anfang der Ig1-Domäne liegt und der Antisense-Primer so, dass er sich am Ende der Ig2-Domäne befindet. Hierfür wurden die 46 Sequenzen mittels MegAlign verglichen und der Anfang der Ig1-Domäne und das Ende der Ig2-Domäne bestimmt.

Die Sequenz des Sense-Primers ergab sich aus der Consensus-Sequenz der 46 DNA-Sequenzen am Anfang der Ig1-Domäne mit den Vorgaben, dass die Länge des Primers zwischen 18 und 21 Basenpaaren (bp) betragen sollte, der Leserahmen nicht verschoben werden durfte und dass das 3'-Ende des Primers besonders gut an möglichst viele CHIRs binden sollte, also sehr konserviert sein sollte. Für das letzte Kriterium wurde im Anfangsbereich der Ig1-Domäne ein 3-5 bp langer Bereich gesucht, der in allen 46 DNA-Sequenzen identisch ist („maximaler Consensus“). Dieser wurde mit der Sequenz „CTG“ gefunden und ergab so das Ende des Sense-Primers (s. Abbildung 9). Da sich bei den Ig-ähnlichen Rezeptoren alle extrazytoplasmatischen Exons in Phase 1 befinden [18] (s. 2.2.5.), wurde - damit es zu keiner Verschiebung des Leserahmens kommt - die letzte Base der Consensus-Sequenz des Signalpeptids als erste Base des Sense-Primers hinzugenommen. In Abbildung 9 ist der Vergleich der 46 DNA-Sequenzen am Anfangsbereich der Ig1-Domäne mit Kennzeichnung des maximalen Consensus „CTG“ und des Sense-Primers ohne die erste Base und die EcoRI-Schnittstelle dargestellt.



**Abbildung 9: Darstellung der genomischen Sequenz von 46 – mit MegAlign verglichenen - LSL-Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen im Anfangsbereich des Exons für die Ig1-Domäne**

Der vertikale Strich kennzeichnet das Ende des Introns und den Anfang des Exons für die Ig1-Domäne. Die 3 Basen „CTG“, die in allen 46 LSL-Sequenzen identisch sind (maximaler Consensus), sind durch eine Umrandung gekennzeichnet. Diese 3 Basen markieren das 3'-Ende des Sense-Primers und der Sense-Primer ist in der Consensus-Sequenz in der 1. Zeile der Abbildung („Consensus #1“) ohne die erste Base und die Sequenz für die EcoRI-Schnittstelle durch eine gestrichelte Umrandung gekennzeichnet. Die schwarz hinterlegten Basen sind Basen, die nicht der Consensus-Sequenz #1 entsprechen. Die Base der Consensussequenz an einer bestimmten Stelle ist diejenige Base, die in mehr als der Hälfte der Sequenzen an dieser Stelle identisch war.

Die Sequenz des Antisense-Primers wurde auf ähnliche Weise wie die Sequenz für den Sense-Primer bestimmt. Als erstes wurde im Endbereich der Ig2-Domäne eine Sequenz von 3 bis 5 bp gesucht, die in allen 46 DNA-Sequenzen identisch ist. Bei dieser handelte es sich um „TGA“ und diese Sequenz wurde für die Generierung des 3'-Ende des Antisense-Primers verwendet. Damit der Leserahmen nicht verschoben wurde, musste noch eine Base an das Ende des Antisense-Primers mitgenommen werden, welche das G – also in komplementärer Form das C – war. Dieses G war beinahe ein maximaler Consensus zwischen allen 46 DNA-Sequenzen, nur 3 Sequenzen („LSL CHIR2-A17“, „LSL CHIR2-B7“ und „LSL CHIR2-A23“) hatten ein A anstelle des C's (s. Abbildung 10). Der Vergleich der 46 DNA-Sequenzen ist mit der Kennzeichnung des maximalen Consensus „TGA“ und des Antisense-Primers in komplementärer Form und ohne die EcoRI-Schnittstelle in Abbildung 10 dargestellt.



Die auf diese Weise bestimmten Sequenzen für den Sense- und den Antisense-Primer wurden mit dem Palindrom für die EcoRI-Schnittstelle (GAATTC) an ihrem 5'-Ende versehen und die Primer 1253 (GAATTCCTGCCCCGACCCTCCCTG) und 1254 (GAATTCTGCAGGTGTGGGTGTCAC) durch die Firma MWG synthetisiert.

### 5.1.2. Design eines geeigneten Primerpaars für die direkte Klonierung von CHIRs mit 2 Ig-Domänen in den Zeta-Vektor

Die beiden Primer 1266 und 1267 entsprechen in ihrer Sequenz der Sequenz von 1253 bzw. 1254 bis auf die 2 zusätzlichen Basen A und T an dem jeweiligen 5'-Ende. Diese Primer wurden entworfen, um – mit diesen Primern gewonnene - PCR-Produkte direkt nach Gelaufreinigung und EcoRI-Verdau in den Zeta-Vektor (s. Abbildung 7) ligieren zu können. Da Restriktionsenzyme aber ein wenig Platz brauchen, um sich an zu heften, wurden am 5'-Ende der Restriktionsenzymchnittstelle noch 2 Basen (A und T) angefügt. Die Sequenzen der beiden Primer 1266 und 1267 sind in Tabelle 1 zu sehen.

## 5.2. Erweiterung der Nomenklatur für CHIRs mit 2 Ig-Domänen

Die bisherige Nomenklatur für CHIRs beruht darauf, ob ein Rezeptor eine potentiell inhibitorische (CHIR-Bn), eine potentiell aktivierende (CHIR-An) oder beide Funktionen (CHIR-ABn) hat (s. 2.2.6.5.). Die Einteilung, ob ein Rezeptor hemmende, aktivierende oder beide Funktionen haben könnte, wird anhand des Aufbaus der transmembranen und intrazellulären Domänen bestimmt. Da sich die vorliegende Dissertation mit dem extrazellulären Teil von CHIRs mit 2 Ig-Domänen beschäftigt, konnte die in der Literatur bisher verwendete Nomenklatur nicht auf die Sequenzen, die in dieser Arbeit gefunden wurden, angewendet werden. Somit wurde eine neue Nomenklatur verwendet, die sich aus der Hühnerlinie, der Bezeichnung „CHIR2“ (zur Kennzeichnung, dass es sich um CHIRs mit 2 Ig-Domänen handelt) und einer internen Nummer zusammensetzt. So bedeutet z.B. „M11 CHIR2-681“, dass es sich um die Sequenz der Nummer „681“ handelt, welche ein CHIR mit 2 Ig-Domänen aus dem Huhn der Hühnerlinie M11 ist.

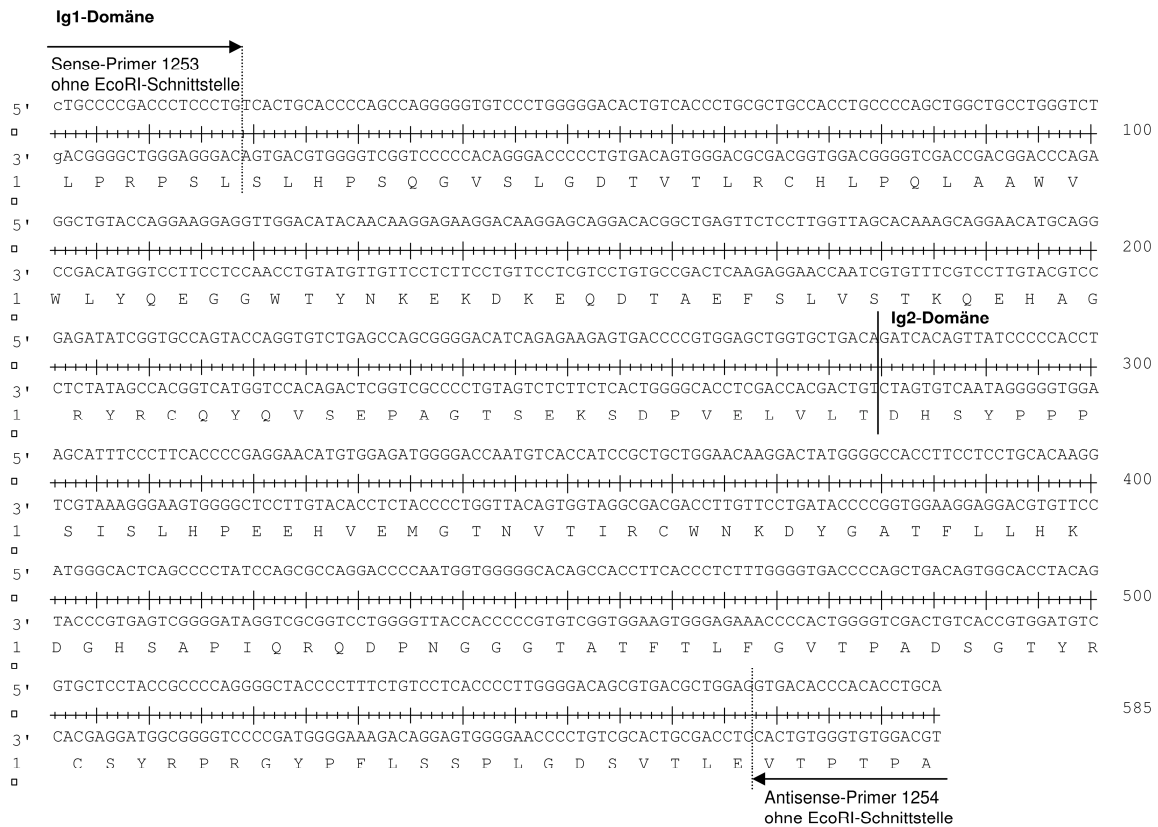
### 5.3. Ergebnisse der Untersuchungen am Huhn der Linie M11

#### 5.3.1. Identifizierung von 142 Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen in PBMCs

Bei dem Huhn der Linie M11 wurde eine Herculase-PCR (s. 4.5.1.) mit den Primern 1253 und 1254 (s. Tabelle 1) auf cDNA aus PBMC durchgeführt. Nach einer Gelelektrophorese wurde die Bande bei ca. 600 bp aufgereingt, TA-kloniert und chemisch kompetente TOP10 E. coli mit den so erhaltenen Plasmiden transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf vier LB-Amp-Platten ausgespatelt (zwei Platten à 100 µl, eine Platte à 50 µl und eine Platte mit dem Rest der Transformation) und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Von allen gewachsenen Einzelkolonien wurde eine Bakterien-PCR mit den Primern 1253 und 1254 gemacht (s. Abbildung 12) und - nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR – aus den Kolonien, die ein Insert der richtigen Länge (ca. 600 bp) hatten, die Plasmide aufgereinigt und diese zu GATC zum Sequenzieren geschickt.

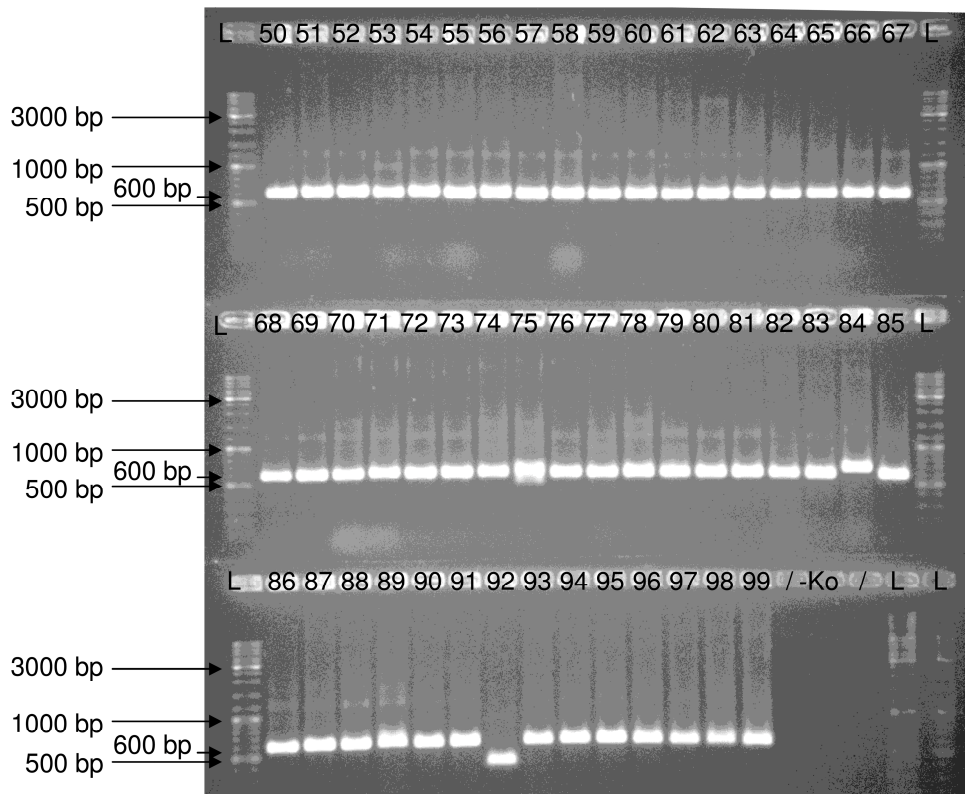
Die Länge des Inserts ergab sich aus der Länge der Ig1- und Ig2-Domäne, die mit den Primern 1253 und 1254 vervielfältigt werden sollte (585 bp) plus der 12 Basenpaare für die beiden EcoRI-Schnittstellen (2 x 6 bp), betrug also 597 bp bzw. ca. 600 bp. Die Länge der Ig1- und Ig2-Domäne, die mit den Primern 1253 und 1254 vervielfältigt werden sollte (585 bp), wurde vorher anhand der Consensussequenz der 46 Sequenzen, die für die Primersynthese (s. 5.1.1.) verwendet worden sind, bestimmt. Hierfür wurde die letzte Base des Consensus des zweiten Exons für das Signalpeptid mit der Consensussequenz des Exons der Ig1-Domäne und der Consensussequenz des Exons der Ig2-Domäne ohne die letzten sieben bp verbunden. Dass die letzten sieben bp des Exons für die Ig2-Domäne nicht mit vervielfältigt werden konnten lag an der Lage des Antisense-Primers (s. Abbildung 10). Die Karte zur Bestimmung der Länge des Inserts ist in Abbildung 11 wiedergegeben.





**Abbildung 11: Zusammengesetzte Consensussequenz der 46 LSL-Sequenzen zur Bestimmung der Länge des Inserts**

Die letzte Base des Consensus des zweiten Exons des Signalpeptids (erste Base der Karte (kleines c)) wurde mit der Consensussequenz des Exons für die Ig1-Domäne und der Consensussequenz des Exons für die Ig2-Domäne ohne die letzten 7 bp in einer genetischen Karte verbunden. Anhand der Länge dieses Consensus konnte die Länge der CHIRs mit 2 Ig-Domänen bestimmt werden, die mit den Primern 1253 und 1254 kloniert und vervielfältigt werden sollten. In der Karte sind zusätzlich die Lage des Sense-Primers 1253 und des Antisense-Primers 1254 angegeben. Der durchgehende Strich kennzeichnet das Ende der Ig1-Domäne und den Anfang der Ig2-Domäne.



**Abbildung 12: Bild einer gelelektrophoretischen Auftrennung von 50 verschiedenen PCR-Produkten aus einer Bakterien-PCR mit 50 Einzelkolonien als jeweilige Matrize**

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Bakterien-PCR mit den Primern 1253 und 1254. Als Matrizen dienten die Kolonien 50 bis 99 der Transformation von chemisch kompetenten TOP10 E. coli mit der aufgereinigten Bande der Herculase-PCR mit den Primern 1253 und 1254 auf cDNA von PBMCs des Huhns der Linie M11. Die Produkte dieser Bakterien-PCR sind gelelektrophoretisch aufgetrennt worden und die Nummern 50 – 99 in der Abbildung entsprechen der jeweiligen Matrizen-Kolonie.

„ / „ kennzeichnet, dass die entsprechende Tasche des Gels leer geblieben ist, „L“ steht für die aufgetragene Leiter (Gene Ruler™DNA Ladder Mix) und „-Ko“ für die Negativkontrolle, d.h. ein Bakterien-PCR-Ansatz in welchen keine Bakterienkolonie als Matrize gegeben worden ist. Am linken Bildrand sind Größen der Banden des Markers gekennzeichnet. Wie zu erkennen ist haben alle PCR-Produkte bis auf die Nummer 75, 84 und 92 eine Bande bei ca. 600 bp. Daher wurden diese 3 Kolonien nicht sequenziert.

Insgesamt wurden die Plasmide von 150 Einzelkolonien aufgereinigt und zum Sequenzieren zu GATC geschickt. Als Primer für das Sequenzieren diente der vektorspezifische Primer für die T7-Promotorsequenz (TAATACGACTCACTATAGGG).

142 dieser 150 Plasmide waren auswertbar in Hinblick auf die Sequenz des Inserts, welches sich zwischen den beiden EcoRI-Schnittstellen befand, und daher ergaben sich 142 Nukleotidsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen. Es wurden Inserts der Länge 579 (1 Sequenz), 582 (16 Sequenzen), 585 (122 Sequenzen) und 588 (3 Sequenzen) bp (ohne die 12 bp der 2 EcoRI-Schnittstellen) gefunden.

Mit Hilfe des Programms SeqBuilder wurden die 142 Nukleotidsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen in ihre entsprechende Proteinsequenz umgeschrieben und ergaben so 142 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen.

### 5.3.2. Untersuchung der 142 Sequenzen auf Proteinebene: 98 Unterschiedliche und 58 Identische in 14 Gruppen

Die 142 aus der Sequenzierung (s. 5.3.1.) erhaltenen Sequenzen wurde in dem Programm SeqBuilder in 142 Proteinsequenzen umgeschrieben. Hierfür wurde nur der Teil der DNA-Sequenz verwendet, der für einen CHIR mit 2 Ig-Domänen ohne die Primersequenzen kodierte. Zur Identifizierung dieses Teils der DNA-Sequenz wurden in der von GATC zur Verfügung gestellten genetischen Karte die beiden EcoRI-Schnittstellen eingezeichnet und davon ausgehend sowohl die 24 bp des Sense-Primers als auch die 24 bp des Antisense-Primers abgezogen. Somit erhielt man die Sequenz eines CHIRs mit 2 Ig-Domänen ohne die Primersequenz. Diese konnte man als Nukleotidsequenz oder als Proteinsequenz speichern. In Abbildung 13 ist das Vorgehen anhand der Sequenz „M11 CHIR2-682“ dargestellt.

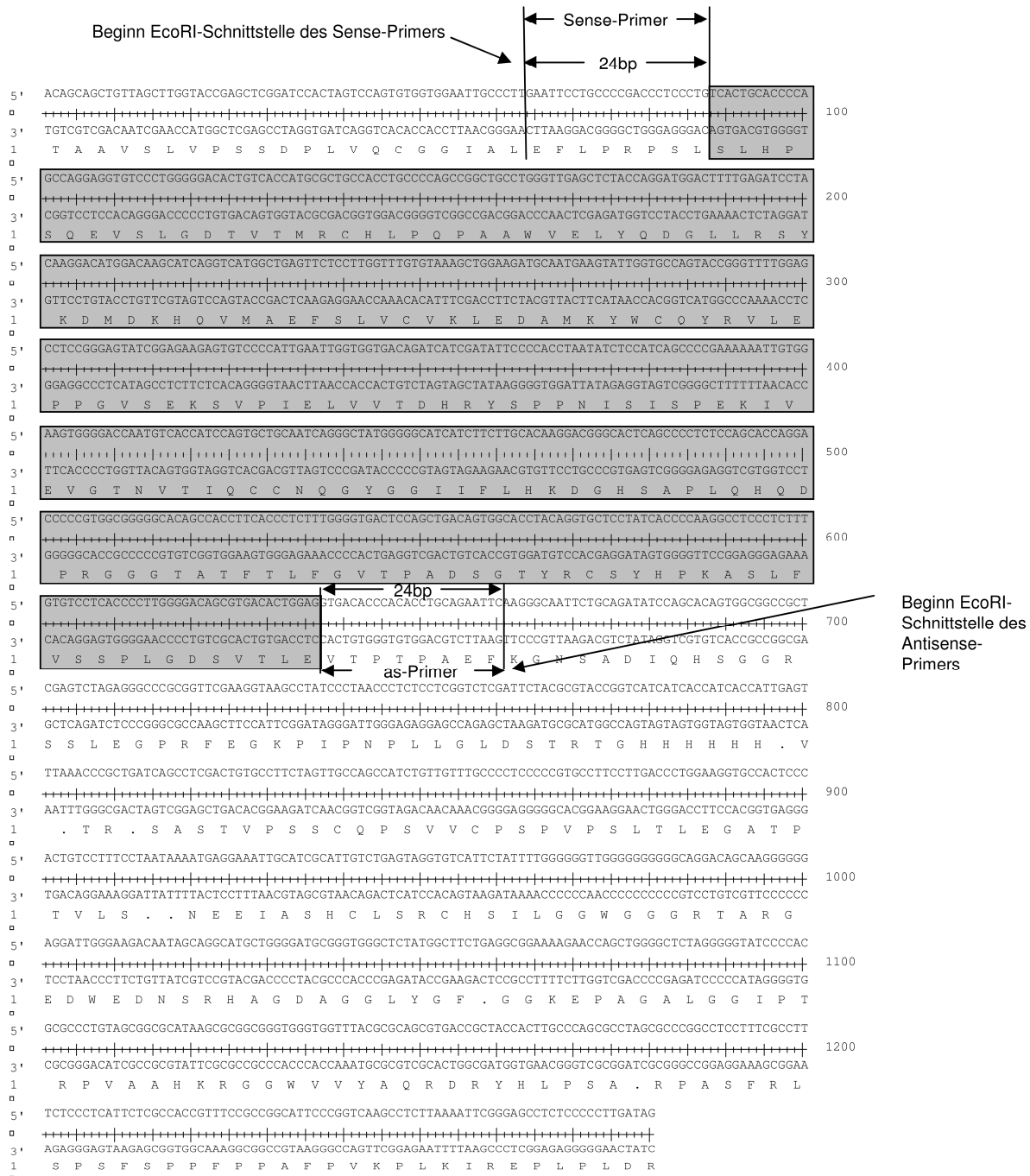


Abbildung 13: Genetische Karte der Sequenzierung von „M11 CHIR2-682“ in pcDNA3.1/V5-His-TOPO®

Die Abbildung zeigt die genetische Karte, die als Sequenzierungsergebnis des MiniPreps der Nummer 682 von GATC zur Verfügung gestellt worden ist. Zur Bestimmung des DNA-Bereichs, der für das Insert kodiert, wurden in der Karte die beiden EcoRI-Schnittstellen aufgesucht und die beiden Anfangsstellen dieser in die Karte eingetragen. Da die Proteinsequenz des Inserts ohne die Sequenz des Sense- und des Antisense-Primers gespeichert werden sollte, wurden diese mit ihrer jeweiligen Länge von 24 bp ebenfalls in die Karte eingezeichnet. Die Sequenz des Inserts „M11 CHIR2-682“-ohne Primer ergibt sich somit aus dem grau hinterlegten Bereich. Diese Sequenz wurde als Basenabfolge (Nukleotidsequenz) oder als Aminosäurenabfolge (Proteinsequenz) gespeichert.

Die 142 auf diese Weise generierten Proteinsequenzen wurden mit Hilfe von Excel miteinander verglichen. Hierfür wurden die Sequenzen auf die Weise in Excel eingefügt, dass in Spalte A die Namen der Sequenzen untereinander standen und in Spalte B die entsprechenden Proteinsequenzen. Danach wurde nach Spalte B alphabetisch sortiert und die Identität von zwei aufeinander folgenden Sequenzen mit dem Befehl in Spalte C - Zeile n „=identisch(B(n-1);Bn)“ überprüft (n steht hierfür für eine beliebige Zeilenzahl). So stand z.B. in Zeile 3 der Spalte C „=identisch(B2;B3)“ und es wurden somit die beiden Sequenzen verglichen, die sich in B2 und B3 der Tabelle befanden. Zur Erläuterung ist in Abbildung 14 ein Beispiel zum Vergleich von 5 Proteinsequenzen mit Hilfe von Excel nach der durchgeführten Sortierung nach Spalte B dargestellt.

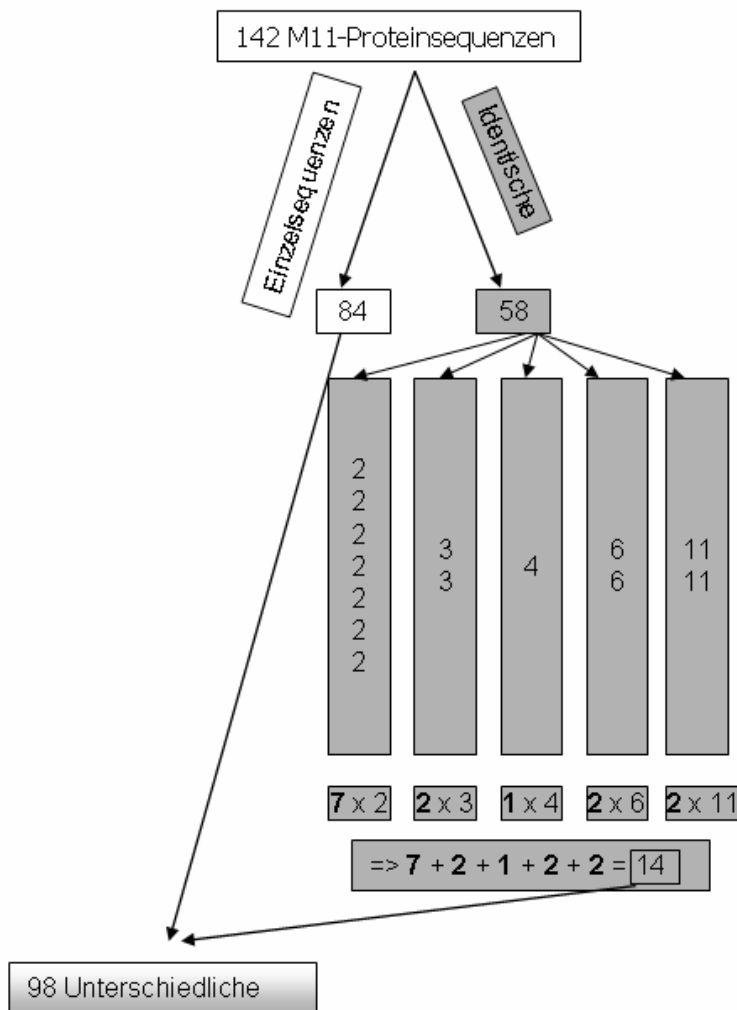
|   | A                 | B   | C      | D                |
|---|-------------------|---|--------|------------------|
| 1 | Name              | Sequenz   |        |                  |
| 2 | M11 CHIR2-779_pro | SLHPSQEVSLGDTYTMRCHLPQPAVWVVELYQDGLLRSYKDMDKHQVMAEFSLVKVEDAMKYWCQYRVLEPPGVSEKSVPIELVYTDHRYSPNICSISHEEIVEVGTNTIQCNCQGYGGIIFLHKDGHSAPLGHQDPRGGGTATFTLFGVTPADSGTYRCSYHPKASLVLSPLGDSVTLF    | FALSCH | identisch(B1;B2) |
| 3 | M11 CHIR2-733_pro | SLHPSQGMSLGDNVTLRCHVPRLAAWVWLYREGGWFYKSGKEKEQDVAEFSFVSTKREHADRYWCQYRVSWSEAESEKSDPVVELVLTDLRYPPSSISLHPEQHVGTGTNTIRCWNKDYGATFLLHKDGSDDPIQRQDSSGGDTATFTLFGVTPADSGTYRCSYRLWRYAFMSSPLGDSVMLE | FALSCH | identisch(B2;B3) |
| 4 | M11 CHIR2-749_pro | SLHPSQGMSLGDNVTLRCHVPRLAAWVWLYREGGWFYKSGKEKEQDVAEFSFVSTKREHADRYWCQYRVSWSEAESEKSDPVVELVLTDLRYPPSSISLHPEQHVGTGTNTIRCWNKDYGATFLLHKDGSDDPIQRQDSSGGDTATFTLFGVTPADSGTYRCSYRLWRYAFMSSPLGDSVMLE | WAHR   | identisch(B3;B4) |
| 5 | M11 CHIR2-757_pro | SLHPSQGMSLGDNVTLRCHVPRLAAWVWLYREGGWFYKSGKEKEQDVAEFSFVSTKREHADRYWCQYRVSWSEAESEKSDPVVELVLTDLRYPPSSISLHPEQHVGTGTNTIRCWNKDYGATFLLHKDGSDDPIQRQDSSGGDTATFTLFGVTPADSGTYRCSYRLWRYAFMSSPLGDSVMLE | WAHR   | identisch(B4;B5) |
| 6 | M11 CHIR2-759_pro | SLHPSQGMSLGDNVTLRCHVPRLAAWVWLYREGGWFYKSGKEKEQDVAEFSFVSTKREHADRYWCQYRVSWSEAESEKSDPVVELVLTDLRYPPSSISLHPEQHVGTGTNTIRCWNKDYGATFLLHKDGSDDPIQRQDSSGGDTATFTLFGVTPADSGTYRCSYRLWRYAFMSSPLGDSVMLE | WAHR   | identisch(B5;B6) |

**Abbildung 14: Ausschnitt aus einer Exceltabelle zum Vergleich von 5 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen**

In der - nach Spalte B sortierten - Abbildung sind in Spalte A die Namen der 5 Sequenzen wiedergegeben. In Spalte B befindet sich die Abfolge der Aminosäuren der Proteinsequenz. Spalte C gibt in ihren Feldern das Ergebnis der Prüfung auf Identität der Sequenzen wieder. Die für die Felder der Spalte C verwendete Formel ohne das =Zeichen ist in dem entsprechenden Feld der Spalte D dargestellt. Der Vergleich der 5 Proteinsequenzen ergab somit, dass 4 Sequenzen identisch sind („M11 CHIR2-733“, „M11 CHIR2-749“, „M11 CHIR2-757“, „M11 CHIR2-759“) und dass die Sequenz „M11 CHIR2-779“ mit keiner der hier aufgeführten Sequenzen identisch ist.

Bei dem Vergleich der 142 Proteinsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen ohne Primer zeigte sich, dass 84 der Sequenzen mit keiner anderen Sequenz identisch waren – also Einzelsequenzen waren - und 58 Stück einen oder mehrere Identische besaßen. Die 58 Stück, die einen oder mehrere Identische hatten, konnten in 14 Gruppen eingeteilt werden. Es gab 7 Gruppen, in denen jeweils 2 Sequenzen identisch waren, 2 Gruppen, in denen jeweils 3 Sequenzen identisch waren, 1 Gruppe, in der 4 Sequenzen identisch waren, 2 Gruppen à 6 Identische und 2

Gruppen à 11 Identische. Die Sequenzen jeder Gruppe dieser 14 Gruppen waren allerdings weder mit Sequenzen anderer Gruppen identisch noch mit einer der 84 Einzelsequenzen. Somit wurde von jeder der 14 Gruppen eine repräsentative Sequenz pro Gruppe zu den 84 Einzelsequenzen genommen und diese 84-plus-14-Sequenzen bildeten dann den Pool der als „unterschiedlich“ definierten Sequenzen. In Abbildung 15 ist das Ergebnis dieser Untersuchung graphisch dargestellt. Die 14 Gruppen der Identischen mit ihren identischen Sequenzen und die 84 Einzelsequenzen können der Abbildung 29 entnommen werden.



**Abbildung 15: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 142 M11-Proteinsequenzen**

Die 142 Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 setzen sich aus 84 Einzelsequenzen und 58 Identischen zusammen. Die Identischen bestehen aus insgesamt 14 verschiedenen Sequenzen, die mehrmals vorkommen. Diese 14 Sequenzen bilden zusammen mit den 84 Einzelsequenzen die 98 Unterschiedlichen. Wie oft eine der 14 verschiedenen Sequenzen vorkommt ist in den grau hinterlegten Balken dargestellt. So kommen 7 Sequenzen 2 Mal vor, 2 Sequenzen sind jeweils 3 Mal identifiziert worden, 1 Sequenz 4 Mal, 2 Sequenzen 6 Mal und 2 Sequenzen 11 Mal.

### 5.3.3. Definition „Unterschiedliche“, „Identische“, „Repräsentant“

Der Ausdruck „Unterschiedliche“ im Zusammenhang mit der Unterteilung der Sequenzen in „unterschiedliche“ und „identische“ gibt die Anzahl der Sequenzen wieder, die Einzelsequenzen sind, d.h. die nur ein Mal gefunden wurden, plus die Anzahl der Gruppen an Identischen, da aus jeder dieser Gruppen eine Sequenz als repräsentative Sequenz der Gruppe von identischen Sequenzen ausgewählt werden musste, um die Gesamtheit der unterschiedlichen Sequenzen zu erhalten. Bei den 98 „unterschiedlichen“ Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11“ sind 84 der „unterschiedlichen“ Einzelsequenzen und 14 der „unterschiedlichen“ die 14 Repräsentanten der 14 Gruppen von Identischen. Somit werden zu den „unterschiedlichen“ Sequenzen auch Sequenzen gezählt, die mit einer oder mehreren anderen identisch sind, die aber innerhalb der Gesamtheit der „unterschiedlichen“ keine gleiche Sequenz besitzen.

Unter dem Ausdruck „Identische“ im Zusammenhang mit der Unterteilung der Sequenzen in „unterschiedliche“ und „identische“ werden alle gefundenen Sequenzen zusammengefasst, die keine Einzelsequenzen sind. Somit gibt die Anzahl der Identischen zwar einen Überblick über die Gesamtanzahl der Sequenzen, die keine Einzelsequenzen sind, allerdings kann aus ihr nicht abgelesen werden, wie viele Sequenzen mehrfach vorkommen, d.h. einen oder mehrere Identische haben. Hierfür dient die Angabe der Gruppen. Somit kann aus der Aussage „58 Identische in 14 Gruppen“ abgelesen werden, dass es 14 Sequenzen gibt, die mehrfach vorkommen und diese 14 Sequenzen - in unterschiedlichem Ausmaß - zu den 58 Identischen beitragen.

Als Repräsentant einer Gruppe von Identischen wurde die Sequenz ausgewählt, die das beste Chromatogramm innerhalb dieser Gruppe der Identischen besaß. Die Gruppenrepräsentanten sind in Abbildung 29 und Abbildung 32 **fett** dargestellt.

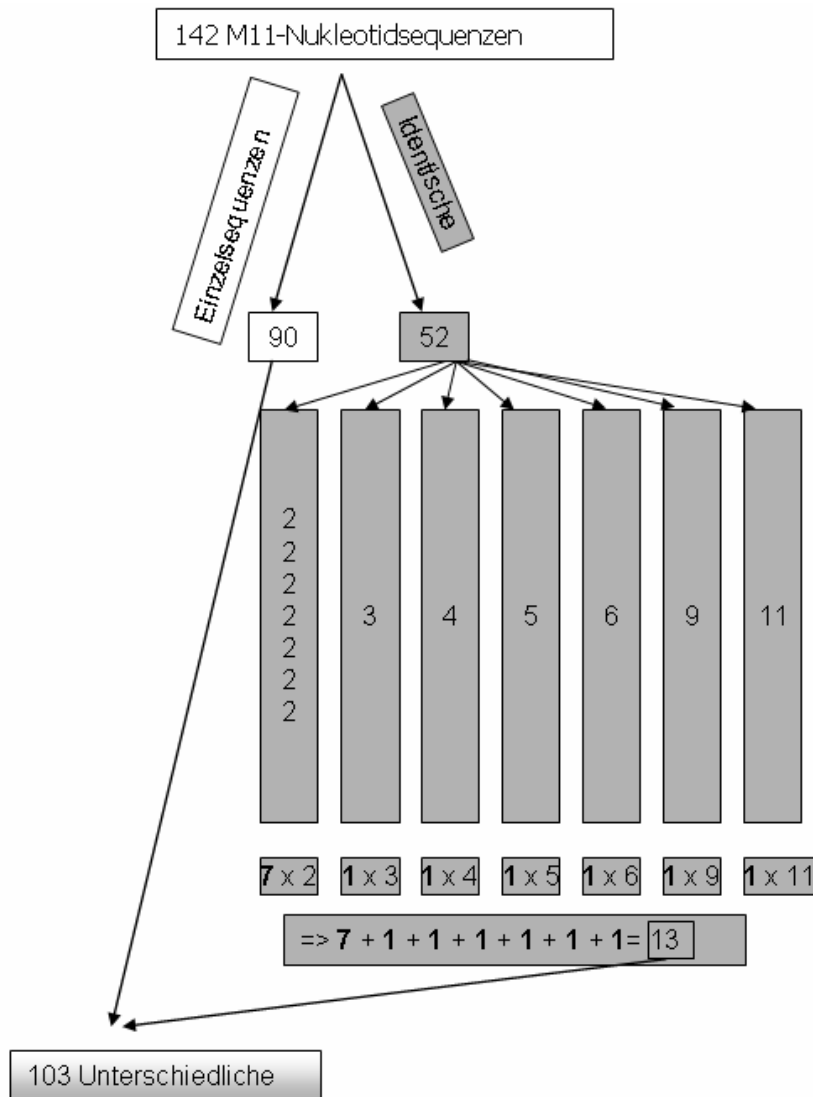
### 5.3.4. Untersuchung der 142 Sequenzen auf Nukleotidebene: 103 Unterschiedliche, 52 Identische in 13 Gruppen

Für die Untersuchung der gefundenen CHIRs mit 2 Ig-Domänen auf Nukleotidebene wurden die Nukleotidsequenzen auf dieselbe Weise - aus den von GATC erhaltenen genetischen Karten - generiert wie die Proteinsequenzen (s. Abbildung 13). Daher wurden die Nukleotidsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen ohne die Sequenzen der Primer verglichen. Der Vergleich dieser erfolgte – wie schon der Vergleich der

142 Proteinsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen – mittels einer Exceltabelle (s. 5.3.2.).

Bei der Untersuchung der 142 gefundenen Nukleotidsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen beim Huhn der Linie M11 zeigte sich, dass 90 der Sequenzen mit keiner anderen Sequenz identisch waren – also Einzelsequenzen waren - und 52 Stück einen oder mehrere identische besaßen. Die 52 Stück, die einen oder mehrere identische hatten, konnten in 13 Gruppen eingeteilt werden. Es gab 7 Gruppen, in denen jeweils 2 Sequenzen identisch waren, 1 Gruppe, in der 3 Sequenzen identisch waren, 1 Gruppe, in der 4 Sequenzen identisch waren , 1 Gruppe à 5 Identische, 1 Gruppe à 6 Identische, 1 Gruppe à 9 Identische und eine Gruppe à 11 Identische. In Abbildung 16 ist das Ergebnis dieser Untersuchung schematisch dargestellt. Die 90 Einzelsequenzen und die 52 identischen Sequenzen können mit den Gruppen der Identischen aus Abbildung 30 im Anhang entnommen werden.





**Abbildung 16: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 142 M11-Nukleotidsequenzen**

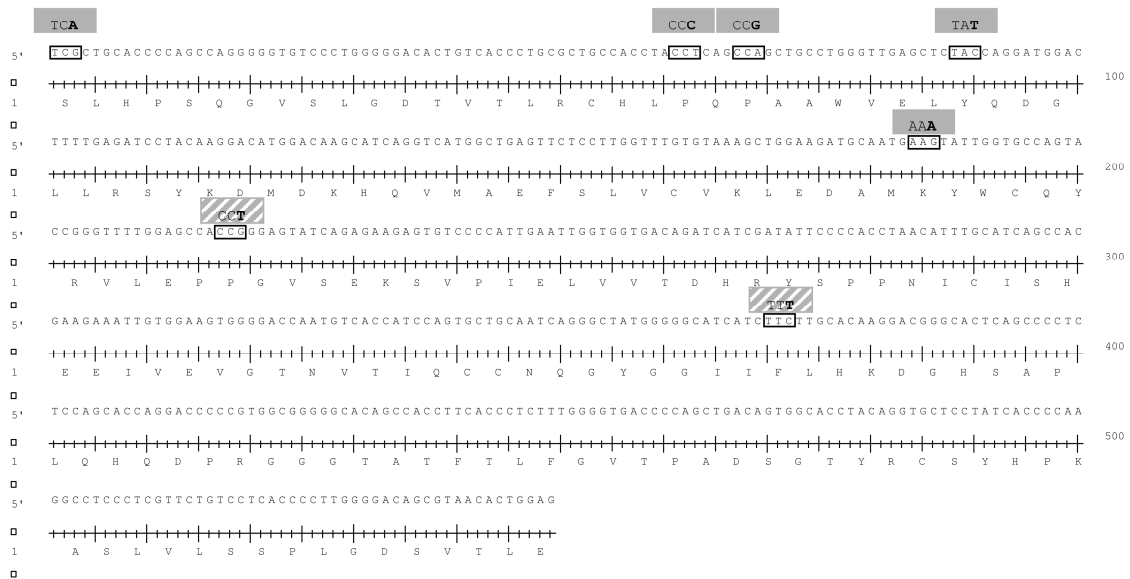
Die 142 Nukleotidsequenzen des Huhns der Linie M11 setzen sich aus 90 Einzelsequenzen und 52 Identischen zusammen. Die Identischen bestehen aus insgesamt 13 verschiedenen Sequenzen, die mehrmals vorkommen. Diese 13 Sequenzen bilden zusammen mit den 90 Einzelsequenzen die 103 Unterschiedlichen. Wie oft eine der 13 verschiedenen Sequenzen vorkommt ist in den grau hinterlegten Balken dargestellt. So kommen 7 Sequenzen 2 Mal vor, 1 Sequenz ist 3 Mal identifiziert worden, 1 Sequenz 4 Mal, 1 Sequenz 5 Mal, 1 Sequenz 6 Mal, 1 Sequenz 9 Mal und 1 Sequenz 11 Mal.

5.3.5. Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung auf Proteinebene und der Untersuchung auf Nukleotidebene:  
5 Unterschiedliche zusätzlich auf Nukleotidebene

Bei der Untersuchung der 142 Sequenzen auf Proteinebene wurden 98 unterschiedliche und 58 identische Sequenzen in 14 Gruppen gefunden (s. 5.3.2.). Die Untersuchung der 142 Sequenzen auf Nukleotidebene ergab 103

unterschiedliche und 52 identische Sequenzen in 13 Gruppen (s. 5.3.4.). Somit zeigte sich eine Differenz von 5 Sequenzen zwischen den „Unterschiedlichen“ zwischen der Untersuchung auf Proteinebene und der Untersuchung auf Nukleotidebene. Um diese 5 Sequenzen herauszufinden, wurde ein Vergleich der 58 Identischen auf Proteinebene mit den 52 Identischen auf Nukleotidebene durchgeführt. Dieser Vergleich ist in Abbildung 31 zu sehen und zeigte, dass bei den Proteinsequenzen unter den Identischen 6 Sequenzen mehr waren als unter den Identischen bei den Nukleotidsequenzen. Diese Sequenzen waren „M11 CHIR2-675.pro“, „M11 CHIR2-821.pro“, „M11 CHIR2-820.pro“, „M11 CHIR2-747.pro“, „M11 CHIR2-676.pro“ und „M11 CHIR2-710.pro“. Diese 6 Sequenzen hatten auf Proteinebene einen oder mehrere Identische, auf Nukleotidebene allerdings nicht. Ein Protein konnte also durch 2 oder mehr unterschiedliche Nukleotidsequenzen gebildet werden.

In der Gruppe der 6 identischen Proteinsequenzen um „M11 CHIR2-675.pro“ (s. Abbildung 31) unterschied sich die Nukleotidsequenz von „M11 CHIR2-675“ von den 5 anderen - nicht nur auf Protein-, sondern auch auf Nukleotidebene identischen Sequenzen – in 1 bp. Bei der Gruppe der 3 identischen Proteinsequenzen um „M11 CHIR2-791.pro“ waren die beiden Sequenzen von „M11 CHIR2-791“ und von „M11 CHIR2-714“ auch auf Nukleotidebene identisch, aber die Nukleotidsequenz von „M11 CHIR2-747“ unterschied sich von diesen in 1 bp. „M11 CHIR2-710“ war auf Proteinebene mit „M11 CHIR2-676“ identisch, auf Nukleotidebene unterschieden sich die beiden Rezeptoren allerdings in 2 bp. In diesen drei Beispielen wurde also ein und dieselbe Proteinsequenz durch 2 verschiedene Nukleotidsequenzen kodiert. Bei der Gruppe der 11 identischen Proteinsequenzen „M11 CHIR2-821.pro, M11 CHIR2-820.pro, M11 CHIR2-803.pro, M11 CHIR2-799.pro, M11 CHIR2-775.pro, M11 CHIR2-763.pro, M11 CHIR2-738.pro, M11 CHIR2-712.pro, M11 CHIR2-702.pro, M11 CHIR2-699.pro, M11 CHIR2-694.pro“ kodierten 3 verschiedene Nukleotidsequenzen ein und dasselbe Protein. Dies waren die 3 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen von „M11 CHIR2-821\_nucleotid“, „M11 CHIR2-820\_nucleotid“ und die Nukleotidsequenz der Gruppe der 9 identischen Nukleotidsequenzen „M11 CHIR2-803\_nucleotid, M11 CHIR2-799\_nucleotid, M11 CHIR2-775\_nucleotid, M11 CHIR2-763\_nucleotid, M11 CHIR2-738\_nucleotid, M11 CHIR2-712\_nucleotid, M11 CHIR2-702\_nucleotid, M11 CHIR2-699\_nucleotid, M11 CHIR2-694\_nucleotid“. Die Abbildung im Anschluss (Abbildung 17) verdeutlicht diesen Fall.



**Abbildung 17: Darstellung der 3 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen von 11 Sequenzen, die auf Proteinebene identisch sind**

Die 11 Sequenzen „M11 CHIR2-821, M11 CHIR2-820, M11 CHIR2-803, M11 CHIR2-799, M11 CHIR2-775, M11 CHIR2-763, M11 CHIR2-738, M11 CHIR2-712, M11 CHIR2-702, M11 CHIR2-699, M11 CHIR2-694“ sind auf Proteinebene identisch, aber auf Nukleotidebene sind nur 9 von ihnen identisch (M11 CHIR2-803, M11 CHIR2-799, M11 CHIR2-775, M11 CHIR2-763, M11 CHIR2-738, M11 CHIR2-712, M11 CHIR2-702, M11 CHIR2-699, M11 CHIR2-694). „M11 CHIR2-821“ und „M11 CHIR2-820“ sind zwar auf Proteinebene identisch, aber nicht auf Nukleotidebene. „M11 CHIR2-821“ unterscheidet sich in 5 bp von den 9 Identischen (M11 CHIR2-803, M11 CHIR2-799, M11 CHIR2-775, M11 CHIR2-763, M11 CHIR2-738, M11 CHIR2-712, M11 CHIR2-702, M11 CHIR2-699, M11 CHIR2-694), „M11 CHIR2-821“ und „M11 CHIR2-820“ unterscheiden sich in 7 bp und „M11 CHIR2-820“ unterscheidet sich in 2 bp von den 9 Identischen. Daher wird ein und dieselbe Proteinsequenz in diesem Fall durch 3 unterschiedliche Nukleotidsequenzen kodiert. In der Abbildung ist die Proteinsequenz der 11 Sequenzen zusammen mit der sie kodierenden Nukleotidsequenz abgebildet. Die abweichenden Triplets von „M11 CHIR2-821\_nucleotid“ und „M11 CHIR2-820\_nucleotid“ sind über der durchgehenden, für die 9 anderen identischen, Nukleotidsequenz dargestellt. Die grau hinterlegten Triplets entsprechen hierbei den Abweichungen von „M11 CHIR2-821\_nucleotid“ und die grau-gestreiften denen von „M11 CHIR2-820\_nucleotid“.

5.3.6. Untersuchung der 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen:  
74 Unterschiedliche, 35 Identische in 11 Gruppen

Zur Abklärung, ob es Ig1-Domänen bzw. Ig2-Domänen gab, die in mehreren – auf Gesamtsequenzebene (Ig1+Ig2) – unterschiedlichen Rezeptoren vorkommen, wurden die 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen in ihre Ig1- und Ig2-Domäne geteilt und diese 98 Ig1-Domänen (bzw. die 98 Ig2-Domänen s. 5.3.7.) auf Identische untersucht. Die Trennung der Proteinsequenz in Ig1- und Ig2-Domäne erfolgte anhand der genetischen Vorgabe durch die Exons. Mit Hilfe der “zusammengesetzten Consensussequenz der 46 LSL-Sequenzen zur Bestimmung der Länge des Inserts“ (s. Abbildung 11), bei der die Grundlage die Exons der Ig1- und der Ig2-Domäne waren (mit Bedacht der Phase 1 dieser beiden Exons), wurden die Aminosäuren am Ende der Ig1-Domäne und am Anfang der Ig2-Domäne bestimmt. Das Ende der Ig1-Domäne wurde in der Consensussequenz durch die Aminosäuren „VLT“ gebildet und die Ig1-Domäne war 87 Aminosäuren lang (ohne Primer). Der Anfang der Ig2-Domäne wurde durch die Aminosäuren „DH“ definiert und die Länge der Ig2-Domäne betrug 96 Aminosäuren (ohne Primer) (s. Abbildung 11). Da nicht alle Sequenzen 183 Aminosäuren lang waren, sondern da es auch Sequenzen mit einer Länge von 181, 182 oder 184 Aminosäuren gab (s. 5.3.1.) und da es sich bei der Auswahl der Aminosäuren, die das Ende der Ig1-Domäne bildeten bzw. bei denen, die den Anfang der Ig2-Domäne bildeten, um die Aminosäuren des Consensus an diesen Stellen handelte, wurde im Bereich von 87 Aminosäuren nach Beginn der Proteinsequenz nach Ähnlichkeiten der Sequenz mit „VLT-DH“ gesucht und die Trennung anhand der Ähnlichkeiten in diesem Bereich vollzogen.

Der Vergleich der Ig1-Domänen erfolgte anhand einer Exceltabelle (s. 5.3.2.).

Die Ig1-Domänen hatten entweder die „erwartete“ Länge von 87 Aminosäuren (s. 5.3.6.) (79 Stück) oder sie waren 86 Aminosäuren (19 Stück) lang.

Der Vergleich der 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 ergab 74 unterschiedliche und 35 identische Sequenzen in 11 Gruppen. Somit waren es 63 Sequenzen von Ig1-Domänen, die nur 1 x vorkamen, also Einzelsequenzen waren, und 11 Sequenzen, die mehrmals vertreten waren, die die 74 unterschiedlichen bildeten. Diese 11 Sequenzen waren die Gruppenrepräsentanten der folgenden 11 Gruppen von insgesamt 35 identischen Sequenzen: 1 Gruppe mit 6 identischen, 2 Gruppen mit je 5 identischen, 3 Gruppen

à 3 identische Sequenzen und 5 Gruppen, in denen je 2 Sequenzen identisch waren. Diese Aufstellung kann der Abbildung 35 entnommen werden.

Anzumerken ist, dass es sich bei den in dieser Untersuchung als „Einzelsequenzen“ bezeichneten Sequenzen nicht unbedingt um Sequenzen handelt, die nur 1 Mal vorkommen, da die Untersuchung der Ig1-Domäne nur anhand der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen der 142 gefundenen des Huhns der Linie M11 durchgeführt worden ist. Somit besitzen einige - als „Einzel-Ig1-Sequenzen“ bezeichnete Ig1-Domänen - sehr wohl identische Sequenzen, die allerdings schon bei der Zusammenstellung der 98 unterschiedlichen Sequenzen (Ig1+Ig2) entfernt worden sind.

### 5.3.7. Untersuchung der 98 Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen: 81 Unterschiedliche, 27 Identische in 10 Gruppen

Das Vorgehen entspricht dem unter 5.3.6. beschriebenen.

Die Länge der Proteinsequenzen der Ig2-Domäne variierte zwischen 94 und 97 Aminosäuren: 1 Sequenz war 94 Aminosäuren lang, 10 hatten eine Länge von 97 Aminosäuren und 87 entsprachen der „erwarteten“ Länge (s. 5.3.6.) von 96 Aminosäuren.

Der Vergleich der 98 Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 ergab 81 unterschiedliche Sequenzen und 27 identische in 10 Gruppen. Die 27 identischen Sequenzen der Ig2-Domänen teilten sich auf 6 Gruppen à 2 Identische, 2 Gruppen mit je 3 Identischen, 1 Gruppe mit 4 identischen Sequenzen und 1 Gruppe mit 5 Identischen auf.

Somit gab es bei den 142 gefundenen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen 81 verschiedene Ig2-Domänen-Proteinsequenzen, die sich mit 74 unterschiedlichen Proteinsequenzen für die Ig1-Domäne (s. 5.3.6.) paarten. Der Vergleich kann der Abbildung 36 entnommen werden.

Auch hier gilt das im letzten Absatz von 5.3.6. zu der Bezeichnung „Einzel-Ig-Sequenz“ Gesagte entsprechend.

## 5.4. Ergebnisse der Untersuchungen am Huhn der Linie R11

### 5.4.1. Identifizierung von 117 Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen in PBMCs

Von dem Huhn der Linie R11 wurde im Alter von 4 Monaten Blut genommen, die PBMC's aus diesem Blut gewonnen, die RNA aus diesen Zellen präpariert und die cDNA aus dieser RNA hergestellt. Diese cDNA diente einerseits als Matrize in einer Herculase-PCR mit den Primern 1253 und 1254 (s. Tabelle 1) – die dem Vorgehen bei M11 entsprechende PCR –, andererseits als Matrize in einer Herculase-PCR mit den Primern 1266 und 1267 (s. Tabelle 1). Das weitere Vorgehen nach der Herculase-PCR mit den Primern 1253 und 1254 entspricht dem unter 5.3.1. beschriebenen weiteren Vorgehen.

Bei der Herculase-PCR mit den Primern 1266 und 1267 wurde nach einer Gelelektrophorese die Bande bei ca. 600 bp aufgereinigt, ein Restriktionsenzymverdau mit EcoRI und - statt der TA-Klonierung - eine Ligation des aufgereinigten und geschnittenen PCR-Produktes mit dem Zeta-Vektor durchgeführt. Danach folgte die Transformation von chemisch kompetenten TOP10 E. coli mit den so erhaltenen Plasmiden, das Ausspateln der Bakterien auf LB-Amp-Platten und eine Inkubation der Platten für 18 h bei 37 °C. Von allen gewachsenen Einzelkolonien wurde eine Bakterien-Richtungs-PCR mit den Primern 742 und 1267 (s. Tabelle 2) gemacht und - nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR – aus den Kolonien, die eine Bande der richtigen Länge (ca. 700 bp) hatten, die Plasmide aufgereinigt und diese zu GATC zum Sequenzieren geschickt. Die Länge der Bande leitete sich aus der Länge eines Inserts eines CHIRs mit 2 Ig-Domänen (ca. 597 bp (s. Abbildung 13 und 5.3.1.)) plus 112 bp ab, da der Primer „742“ 112 bp vor dem Beginn der ersten EcoRI-Schnittstelle liegt (597 bp plus 112 bp ergab so 697 bp bzw. ca. 700 bp). Die Herculase-PCR mit den Primern 1266 und 1267 wurde aus dem Grund gemacht, da ein Ziel dieser Arbeit darin bestand, Liganden mittels stabil exprimierten Rezeptoren zu finden. Diese Rezeptoren sollten über den Zeta-Vektor mittels Elektroporation in BWZ.36-Zellen verbracht werden. Da bei der Herculase-PCR mit den Primern 1253 und 1254 die Rezeptoren nach der Klonierung als Inserts des Vektors pcDNA3.1/V5-His-TOPO® vorlagen, war hier noch der zusätzliche Schritt des „Umklonierens“ des CHIRs aus dem Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO® in den Zeta-Vektor notwendig (s. 5.8.3.). Dieser Schritt des Umklonierens sollte durch

die Herculase-PCR mit den Primern 1266 und 1267 mit anschließendem EcoRI-Verdau und direkte Ligation in den Zeta-Vektor umgangen werden.

Insgesamt wurden die Plasmide aus 139 Einzelkolonien aufgereinigt und zum Sequenzieren zu GATC geschickt. 9 dieser Kolonien enthielten ein Insert im Zeta-Vektor, 130 Kolonien enthielten ein Insert im pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor. Als Primer für das Sequenzieren diente - sowohl beim pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor als auch beim Zeta-Vektor - der Primer für die T7-Promotorsequenz (TAATACGACTCACTATAGGG).

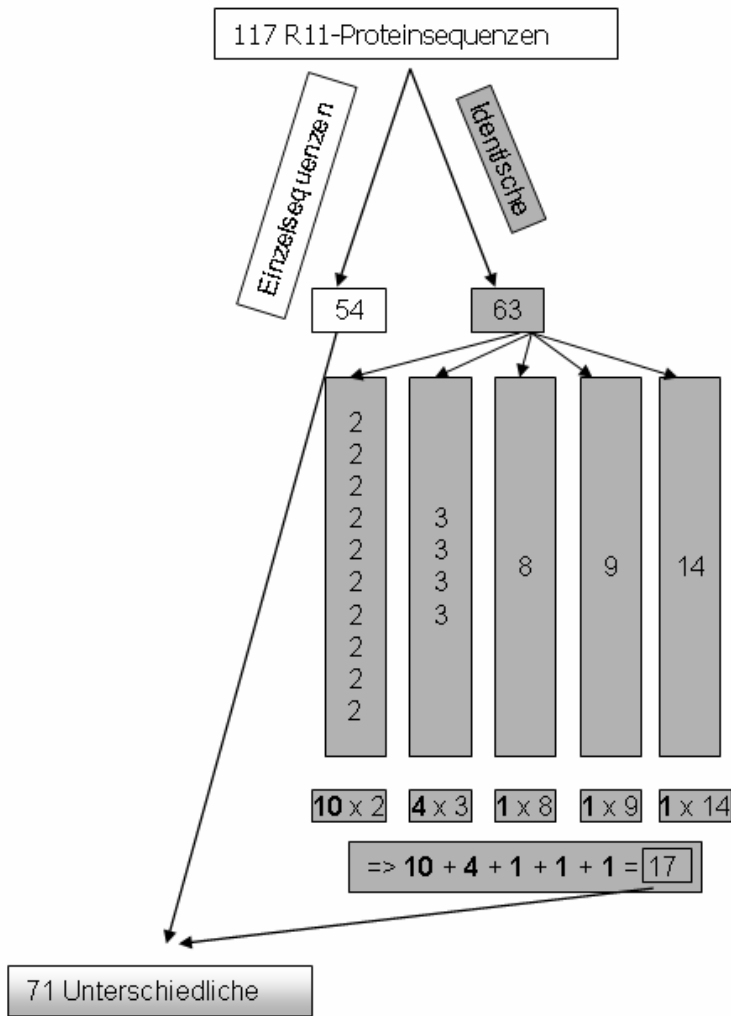
117 der 139 zu GATC geschickten Plasmide waren auswertbar und somit ergaben sich 117 Nukleotidsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus dem Huhn der Linie R11. 115 dieser hatten eine Länge von 585 bp und 2 eine Länge von 573 bp (ohne die 12 bp der 2 EcoRI-Schnittstellen).

Wie bei M11 wurden die 117 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus dem Huhn R11 durch Umschreibung der Nukleotidsequenzen mit Hilfe des Programms SeqBuilder generiert.

#### 5.4.2. Untersuchung der 117 Sequenzen auf Proteinebene: 71 Unterschiedliche, 63 Identische in 17 Gruppen

Das Vorgehen zur Generierung der 117 Proteinsequenzen aus den - aus der Sequenzierung durch GATC - erhaltenen Sequenzen entspricht exakt dem unter 5.3.2. beschriebenen Vorgehen. Daher sind diese 117 Proteinsequenzen aus dem jeweiligen DNA-Bereich hergeleitet, der für den CHIR mit 2 Ig-Domänen ohne die Primersequenzen kodiert. Die 117 auf diese Weise generierten Proteinsequenzen wurden mit Hilfe von Excel miteinander verglichen. Auch hier entspricht das Vorgehen dem bei dem Vergleich von M11 verwendeten (s. unter 5.3.2.).

Bei dem Vergleich der 117 Proteinsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen ohne Primer zeigte sich, dass 54 der Sequenzen mit keiner anderen Sequenz identisch waren – also Einzelsequenzen waren - und 63 Stück einen oder mehrere Identische besaßen. Die 63 Stück, die einen oder mehrere Identische hatten, konnten in 17 Gruppen eingeteilt werden. Es gab 10 Gruppen, in denen jeweils 2 Sequenzen identisch waren, 4 Gruppen mit je 3 Identischen, 1 Gruppe à 8 Identische, 1 Gruppe à 9 Identische und 1 Gruppe mit 14 identischen Sequenzen. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist schematisch in Abbildung 18 dargestellt. Die Exceltabelle zum Vergleich der 117 Proteinsequenzen ist in Abbildung 32 dargestellt.



**Abbildung 18: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 117 R11-Proteinsequenzen**

Die 117 Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11 setzen sich aus 54 Einzelsequenzen und 63 Identischen zusammen. Die Identischen bestehen aus insgesamt 17 verschiedenen Sequenzen, die mehrmals vorkommen. Diese 17 Sequenzen bilden zusammen mit den 54 Einzelsequenzen die 71 Unterschiedlichen. Wie oft eine dieser 17 verschiedenen Sequenzen vorkommt ist in den grau hinterlegten Balken dargestellt. So kommen 10 Sequenzen 2 Mal vor, 4 Sequenzen sind 3 Mal identifiziert worden, 1 Sequenz 8 Mal, 1 Sequenz 9 Mal und 1 Sequenz 14 Mal.

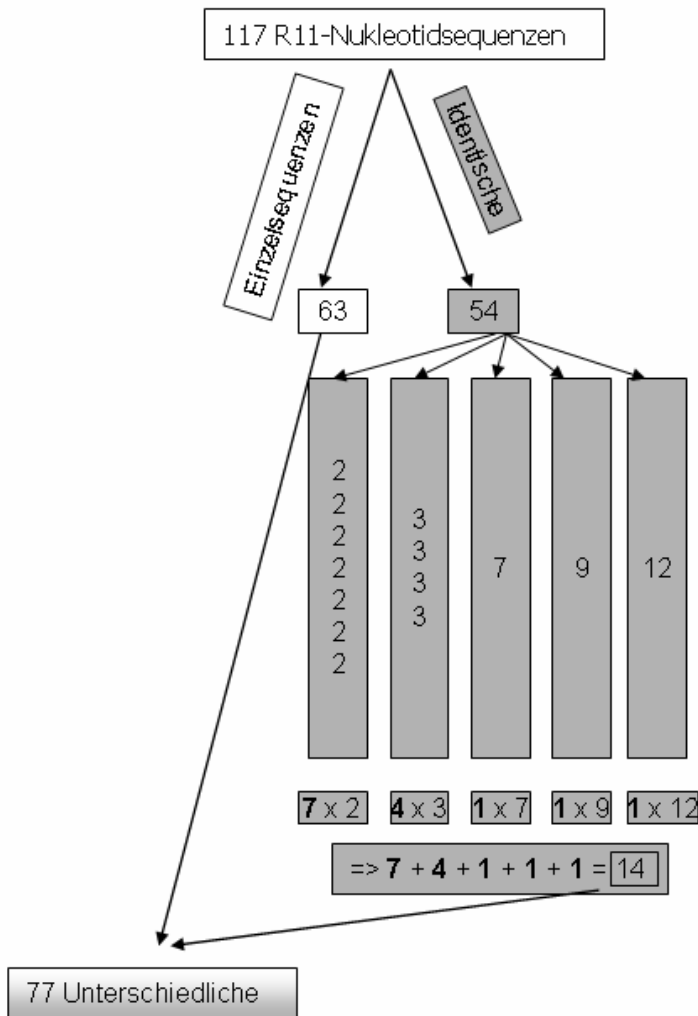
**5.4.3. Untersuchung der 117 Sequenzen auf Nukleotidebene:  
77 Unterschiedliche, 54 Identische in 14 Gruppen**

Für die Untersuchung der gefundenen CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus dem Huhn der Linie R11 auf Nukleotidebene wurden die Nukleotidsequenzen auf dieselbe Weise - aus den von GATC erhaltenen genetischen Karten - generiert wie die Proteinsequenzen (s. Abbildung 13). Daher wurden die Nukleotidsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen ohne die Sequenzen der Primer verglichen. Der Vergleich



dieser erfolgte – wie schon der Vergleich der 117 Proteinsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen – mittels einer Exceltabelle (s. 5.3.2.).

Der Vergleich ergab 63 Einzelsequenzen und 54 Identische in 14 Gruppen. Somit ergaben sich insgesamt 77 unterschiedliche Sequenzen. Bei den 14 Gruppen gab es 7 Gruppen à 2 identische Sequenzen, 4 Gruppen à 3 Identische, 1 Gruppe mit 7 Identischen, 1 Gruppe mit 9 und 1 Gruppe mit 12 identischen Sequenzen. Die nach Sequenz (= Spalte B) sortierten Nukleotidsequenzen (Name und Anfangsbereich der Sequenz) können mit dem Ergebnis der Untersuchung auf Identität von 2 aufeinander folgenden Sequenzen und der Darstellung der Gruppen aus Abbildung 33 entnommen werden. In Abbildung 19 ist das Untersuchungsergebnis schematisch dargestellt.



**Abbildung 19: Darstellung des Untersuchungsergebnisses der 117 R11-Nukleotidsequenzen**

Die 117 Nukleotidsequenzen des Huhns der Linie R11 setzen sich aus 63 Einzelsequenzen und 54 Identischen zusammen. Die Identischen bestehen aus insgesamt 14 verschiedenen Sequenzen, die mehrmals vorkommen. Diese 14 Sequenzen bilden zusammen mit den 63 Einzelsequenzen die 77 Unterschiedlichen. Wie oft eine dieser 14 verschiedenen Sequenzen vorkommt ist in den grau hinterlegten Balken dargestellt. So kommen 7 Sequenzen 2 Mal vor, 4 Sequenzen sind 3 Mal identifiziert worden, 1 Sequenz 7 Mal, 1 Sequenz 9 Mal und 1 Sequenz 12 Mal.

**5.4.4. Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung auf Proteinebene mit der Untersuchung auf Nukleotidebene:  
6 Unterschiedliche zusätzlich auf Nukleotidebene**

Der Vergleich der Anzahl der unterschiedlichen Sequenzen auf Proteinebene (71 Stück, s. 5.4.2.) mit der Anzahl der unterschiedliche Sequenzen auf Nukleotidebene (77 Stück, s. 5.4.3.) ergab eine Differenz von 6 Sequenzen. Zum Herausfinden dieser 6 Sequenzen wurde ein Vergleich der 63 Identischen auf Proteinebene mit

den 54 Identischen auf Nukleotidebene durchgeführt. Aus der Abbildung 34 können die 9 Sequenzen entnommen werden, die die Differenz zwischen den 63 Identischen auf Proteinebene und den 54 Identischen auf Nukleotidebene ausmachen (in der Abbildung grau hinterlegt). Diese 9 Sequenzen haben auf Proteinebene einen oder mehrere Identische, auf Nukleotidebene allerdings nicht. So ist „R11 CHIR2-989“ auf Proteinebene mit „R11 CHIR2-946.pro“ und 12 weiteren Proteinsequenzen identisch (s. Abbildung 34 - Gruppe der 14 Identischen), auf Nukleotidebene unterscheiden sie sich allerdings in 2 bp voneinander und in jeweils einem von den anderen 12 – auch auf Nukleotidebene identischen – Sequenzen. Somit kodieren hier 3 voneinander unterschiedliche Nukleotidsequenzen ein und dasselbe Proteinprodukt.

„R11 CHIR2-838“ ist mit „R11 CHIR2-867“ auf Proteinebene identisch, auf Nukleotidebene unterscheiden sich die beiden Sequenzen aber durch 3 bp. „R11 CHIR2-895“ unterscheidet sich auf Nukleotidebene in 2 bp von „R11 CHIR2-900“, ist auf Proteinebene allerdings mit diesem identisch. „R11 CHIR2-966.pro“ unterscheidet sich auf Nukleotidebene in 1 bp von den sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene identischen Sequenzen von „R11 CHIR2-830“, „R11 CHIR2-877“, „R11 CHIR2-896“, „R11 CHIR2-955“, „R11 CHIR2-965“, „R11 CHIR2-983“, „R11 CHIR2-996“, ist aber auf Proteinebene mit diesen 7 Sequenzen identisch. „R11 CHIR2-943.pro“ ist mit „R11 CHIR2-993.pro“ identisch, die Nukleotidsequenzen dieser beiden CHIRs unterscheiden sich aber in 1 bp. Aus der Abbildung 34 geht auch hervor, warum die Differenz zwischen den unterschiedlichen auf Proteinebene und den unterschiedlichen auf Nukleotidebene nur 6 Sequenzen beträgt. Es werden nur die 6 in der Abbildung fett markierten Sequenzen der 9 grau hinterlegten zusätzlich in die Liste der unterschiedlichen auf Nukleotidebene aufgenommen, da die 3 anderen („R11 CHIR2-838.pro“, „R11 CHIR2-895.pro“ und „R11 CHIR2-943.pro“) im Proteinvergleich als Gruppenrepräsentant der 3 jeweiligen Gruppen an Identischen schon zu den „unterschiedlichen“ Sequenzen gezählt worden sind.

#### 5.4.5. Untersuchung der 71 Ig1-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen: 48 Unterschiedliche, 31 Identische in 8 Gruppen

Das Vorgehen zur Trennung der Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen in ihre Ig1- und Ig2-Domäne erfolgte wie die Trennung der Proteinsequenzen beim

Huhn der Linie M11 (s. 5.3.6.). Der Vergleich der getrennten Sequenzen erfolgte mit einer Exceltabelle.

Die Länge der Proteinsequenzen der Ig1-Domänen betrug bis auf eine Proteinsequenz die „erwartete“ Länge von 87 Aminosäuren (s. 5.3.6.). Die Ig1-Domäne der Proteinsequenz von „R11 CHIR2-943“ hatte eine Länge von 86 Aminosäuren.

Der Vergleich der Ig1-Domäne-Proteinsequenzen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie R11 ergab 48 unterschiedliche Sequenzen. Diese setzten sich aus 40 Proteinsequenzen für die Ig1-Domäne zusammen, die Einzelsequenzen bei dem Vergleich der 71 Ig1-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen der CHIRs des Huhns der Linie R11 waren und 8 Sequenzen, die die 8 Gruppen an Identischen repräsentierten. Diese 8 Gruppen teilten sich auf in 2 Gruppen mit je 2 identischen, 3 Gruppen mit je 3 identischen, 2 Gruppen à 5 identische Sequenzen und 1 Gruppe mit 8 Identischen. Der Vergleich kann der Abbildung 35 entnommen werden.

Auch hier gilt das im letzten Absatz von 5.3.6. zu der Bezeichnung „Einzel-Ig-Sequenz“ Gesagte entsprechend.

#### 5.4.6. Untersuchung der 71 Ig2-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen: 51 Unterschiedliche, 31 Identische in 11 Gruppen

Das Vorgehen entspricht dem unter 5.4.5. beschriebenen Vorgehen.

69 der 71 Ig2-Domäne-Proteinsequenzen hatten die „erwartete“ Länge von 96 Aminosäuren. 1 Sequenz (R11 CHIR2-943\_Ig2.pro) hatte eine Länge von 97 Aminosäuren. Dies war die Sequenz, die in ihrer Ig1-Domäne 1 Aminosäure weniger als der Rest hatte (s. 5.4.5.). Die zweite Sequenz, die eine abweichende Länge hatte, war „R11 CHIR2-894\_Ig2.pro“. Die Länge betrug nur 92 Aminosäuren. Die Ig1-Domäne dieser Sequenz hatte eine Länge von 87 Aminosäuren und somit war dies die Sequenz, die in ihrer Gesamtlänge nur 179 Aminosäuren lang war (s. 5.4.1.) (zusammen mit „R11 CHIR2-980.pro“, mit der „R11 CHIR2-894.pro“ identisch ist).

Beim Vergleich der 71 Proteinsequenzen für die Ig2-Domäne der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie R11 ergaben sich 51 unterschiedliche Sequenzen. 31 Sequenzen hatten einen oder mehrere Identische bei dieser Untersuchung. Sie teilten sich auf in 7 Gruppen à

2 Identische, 2 Gruppen à 3 Identische, 1 Gruppe mit 4 identischen Sequenzen und 1 Gruppe mit 7 Identischen. Der Vergleich ist in Abbildung 36 dargestellt.

Auch hier gilt das im letzten Absatz von 5.3.6. zu der Bezeichnung „Einzel-Ig-Sequenz“ Gesagte entsprechend.

## **5.5. Vergleich der Daten von M11 mit den Daten von R11**

### **5.5.1. Vergleich der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11 mit den 71 unterschiedlichen von R11: 3 Identische**

Die 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen, die bei der Analyse der 142 CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 gefunden wurden, wurden mit den 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen, die bei der Analyse der 117 CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie R11 gefunden worden sind, verglichen. Der Vergleich wurde – wie die vorangegangenen Vergleiche innerhalb einer Hühnerlinie (s. 5.3.2.) – mittels einer Exceltabelle durchgeführt, in welche die 98 unterschiedlichen M11 Proteinsequenzen und die 71 unterschiedlichen R11 Proteinsequenzen gegeben worden sind. Diese 169 Sequenzen wurden dann sortiert und es folgte die Überprüfung der Identität von 2 – nach der Sortierung – aufeinander folgenden Sequenzen.

Der Vergleich der 169 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus 2 verschiedenen Hühnerlinien (98 unterschiedliche Proteinsequenzen aus dem Huhn der Linie M11, 71 unterschiedliche Proteinsequenzen aus dem Huhn der Linie R11) ergab 3 identische Sequenzen zwischen den beiden Hühnerlinien. So war „M11 CHIR2-687.pro“ mit der Sequenz von „R11 CHIR2-881.pro“ identisch, „M11 CHIR2-694.pro“ mit „R11 CHIR2-858.pro“ identisch und die Sequenz von „M11 CHIR2-724.pro“ mit der von „M11 CHIR2-838.pro“. Das Ergebnis des Vergleichs dieser ist in Abbildung 20 dargestellt.

Vergleich von „M11 CHIR2-687“ mit „R11 CHIR2-881“

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| M11 CHIR2-687.pro | SLHPSQGVSLGDTFTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNGKKKEQNTAEFFVSTKREHAGRYWCQYRVSESEVSMKSD                                     | 80  |
| R11 CHIR2-881.pro | SLHPSQGVSLGDTFTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNGKKKEQNTAEFFVSTKREHAGRYWCQYRVSESEVSMKSD                                     | 80  |
|                   | <hr/> 90            100            110            120            130            140            150            160 |     |
| M11 CHIR2-687.pro | PVELVLTDRNFPPPHISLHPEERVRTGTNVTIRCWNKDYGA AFL LHKDGRSAPIQRLV PDDVGAVSFTLFGVTPADSGIY                               | 160 |
| R11 CHIR2-881.pro | PVELVLTDRNFPPPHISLHPEERVRTGTNVTIRCWNKDYGA AFL LHKDGRSAPIQRLV PDDVGAVSFTLFGVTPADSGIY                               | 160 |
|                   | <hr/> 170            180  |     |
| M11 CHIR2-687.pro | RCSYRFPKNYPFLSSPLGDSVTLE  | 183 |
| R11 CHIR2-881.pro | RCSYRFPKNYPFLSSPLGDSVTLE  | 183 |

Vergleich von „M11 CHIR2-694“ mit „R11 CHIR2-858“

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| M11 CHIR2-694.pro | SLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPQPAAWVELYQDGLLSYKDMDKHQVMAEFSLVCKLEDAMKYWCQYRVLEPPGVSEKSV                                    | 80  |
| R11 CHIR2-858.pro | SLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPQPAAWVELYQDGLLSYKDMDKHQVMAEFSLVCKLEDAMKYWCQYRVLEPPGVSEKSV                                    | 80  |
|                   | <hr/> 90            100            110            120            130            140            150            160 |     |
| M11 CHIR2-694.pro | PIELVVTDHRYSPPNICISHEEIVEVGTNVTIQCCNQYGGIIFLHKDGHSA PLQH QDPRGGGTATFTLFGVTPADSGTY                                 | 160 |
| R11 CHIR2-858.pro | PIELVVTDHRYSPPNICISHEEIVEVGTNVTIQCCNQYGGIIFLHKDGHSA PLQH QDPRGGGTATFTLFGVTPADSGTY                                 | 160 |
|                   | <hr/> 170            180  |     |
| M11 CHIR2-694.pro | RCSYHPKASLVLSPLGDSVTLE  | 183 |
| R11 CHIR2-858.pro | RCSYHPKASLVLSPLGDSVTLE  | 183 |

Vergleich von „M11 CHIR2-724“ mit „R11 CHIR2-838“

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| M11 CHIR2-724.pro | SLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPQPAAWVELYQDGLLSYKDMDKHQVMAEFSLVCKLEDAMKYWCQYRVLEPPGVSEKSV                                    | 80  |
| R11 CHIR2-838.pro | SLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPQPAAWVELYQDGLLSYKDMDKHQVMAEFSLVCKLEDAMKYWCQYRVLEPPGVSEKSV                                    | 80  |
|                   | <hr/> 90            100            110            120            130            140            150            160 |     |
| M11 CHIR2-724.pro | PIELVVTDHRYSPPNISISHEKTVEVGTNVTIQCCNQYGGIIFLHKDGHSA PLQH QDSRGGGTATFILFGVTPADSGTY                                 | 160 |
| R11 CHIR2-838.pro | PIELVVTDHRYSPPNISISHEKTVEVGTNVTIQCCNOGYGGIIFLHKDGHSA PLOHDSRGGGTATFILFGVTPADSGTY                                  | 160 |
|                   | <hr/> 170            180  |     |
| M11 CHIR2-724.pro | RCSYHPKASLVSSPLGDSVTLE  | 183 |
| R11 CHIR2-838.pro | RCSYHPKASLVSSPLGDSVTLE  | 183 |

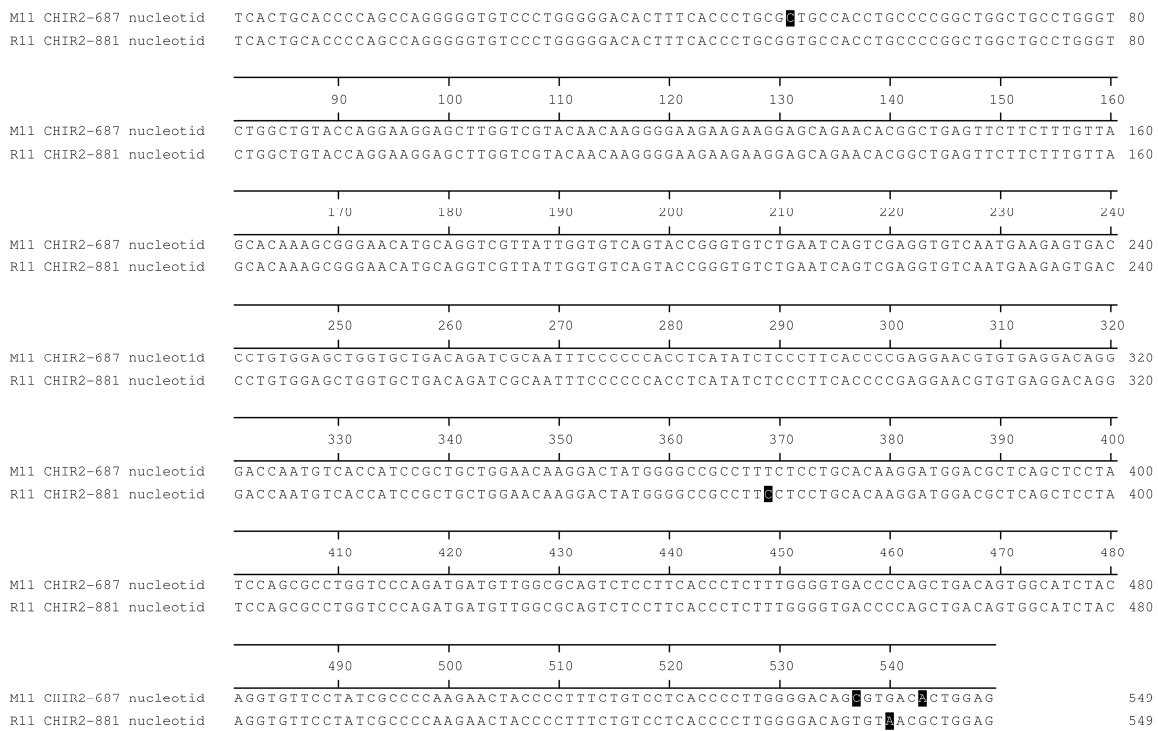
**Abbildung 20: 3 Vergleiche der identischen Proteinsequenzen zwischen M11 und R11**

Der Vergleich der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 mit den 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11 lieferte 3 Gruppen à je 2 identische Sequenzen zwischen den beiden Hühnerlinien. Die 3 Vergleiche dieser 3 Gruppen sind in der Abbildung dargestellt.

### 5.5.2. Vergleich der 103 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen von M11 mit den 77 unterschiedlichen von R11: 2 Identische

Die 103 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen des Huhns der Linie M11 wurden mit Hilfe einer Exceltabelle mit den 77 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen des Huhns der Linie R11 verglichen. Das Vorgehen glich dem unter 5.3.2. beschriebenen.

Der Vergleich der 180 Nukleotidsequenzen ergab 2 identische Sequenzen zwischen M11 und R11. So war die Nukleotidsequenz von „M11 CHIR2-694“ mit der von „R11 CHIR2-858“ identisch und die von „M11 CHIR2-724“ mit der von „R11 CHIR2-838“. Allerdings waren die beiden Nukleotidsequenzen von „M11 CHIR2-687“ und „R11 CHIR2-881“ nicht identisch, auf Proteinebene ergaben diese beiden Sequenzen allerdings ein und dasselbe Produkt (s. unter 5.5.1.). Diese beiden Sequenzen unterschieden sich auf Nukleotidebene in 5 bp (s. Abbildung 21).



**Abbildung 21: Vergleich von „M11 CHIR2-687“ und „R11 CHIR2-881“**

Die beiden Sequenzen sind auf Proteinebene identisch (s. **Abbildung 20**), auf Nukleotidebene unterscheiden sie sich allerdings in 5 bp (schwarz hinterlegt).

Sowohl die Sequenz von „M11 CHIR2-687.nucleotid“ hatte auf Proteinebene mit „M11 CHIR2-774.pro“ allerdings eine identische Sequenz und ist als Gruppenrepräsentant aufgrund seines Chromatogramms für die weiteren

Untersuchungen ausgewählt worden, als auch „M11 CHIR2-694.nucleotid“, welche auf Proteinebene sogar mit 10 anderen Sequenzen identisch war. Ebenso verhielt es sich mit der Sequenz von „R11 CHIR2-881.pro“: diese war mit den Sequenzen „R11 CHIR2-941.pro“ und „R11 CHIR2-942.pro“ auf Proteinebene identisch. Auch „R11 CHIR2-838.pro“ hatte eine identische Sequenz auf Proteinebene („R11 CHIR2-867.pro“). Um daher eine Aussage darüber treffen zu können, ob die 3 zwischen den beiden Hühnerlinien identischen Sequenzen wirklich nur von jeweils einer Nukleotidsequenz kodiert wurden, mussten die Ergebnisse des Vergleichs dieser Sequenzen auf Nukleotidebene (s. 5.3.4. und 5.4.3.) mit einbezogen werden.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass „M11 CHIR2-687“ und „M11 CHIR2-774“ auch auf Nukleotidebene identisch sind. „R11 CHIR2-881.nucleotid“ ist mit der Sequenz von „R11 CHIR2-941.nucleotid“ und der von „R11 CHIR2-942.nucleotid“ identisch. Daher wird die identische Sequenz „M11 CHIR2-687.pro“/ „R11 CHIR2-881.pro“ zwischen M11 und R11 durch 2 unterschiedliche Nukleotidsequenzen gebildet.

Bei „M11 CHIR2-694.nucleotid“ waren 9 der 11 auf Proteinebene identischen Sequenzen auch auf Nukleotidebene identisch, allerdings unterschieden sich die Nukleotidsequenzen von „M11 CHIR2-820“ und „M11 CHIR2-821“ voneinander und den anderen 9 Sequenzen. Da die Sequenz von „R11 CHIR2-858“ keinen Identischen auf Proteinebene hatte, wurde diese identische Sequenz zwischen M11 und R11 durch 3 unterschiedliche Nukleotidsequenzen gebildet.

Da „M11 CHIR2-724“ keine identische Sequenz auf Proteinebene hatte, mussten nur noch die Nukleotidsequenzen von „R11 CHIR2-838“ und „R11 CHIR2-867“ überprüft werden. Diese unterschieden sich allerdings in 3 bp. Daher wurde diese zwischen M11 und R11 auf Proteinebene identische Sequenz durch 2 unterschiedliche Nukleotidsequenzen gebildet.

### 5.5.3. Vergleich der 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11 mit den 71 Ig1-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen von R11: 119 Unterschiedliche, 67 Identische in 17 Gruppen

Der Vergleich der Ig1-Domänen der 98 in der gesamten Länge (Ig1+Ig2) unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 mit den 71 Ig1-Domänen der in der gesamten Länge unterschiedlichen Proteinsequenzen des



Huhns der Linie R11 erfolgte anhand einer Exceltabelle. Der Vergleich wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob es Ig1-Domänen gab, die sowohl im Huhn der Linie M11 als auch in dem Huhn der Linie R11 vorkommen.

Dass es Ig1-Domänen gab, die mehrmals innerhalb der 98 Ig1-Domänen der 98 – auf gesamter Länge – unterschiedlichen Proteinsequenzen für CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11, vorkamen bzw. mehrmals innerhalb der 71 Ig1-Domänen der 71 – auf gesamter Länge – unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11 vorkamen, wurde bereits in 5.3.6. und 5.3.7. gezeigt. Ebenso war – aufgrund des Ergebnis, dass es 3 identische Sequenzen zwischen den 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 und den 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11 gab (s. 5.5.1.) – klar, dass es zwischen den Ig1-Domänen von M11 und den Ig1-Domänen von R11 mindestens diese 3 Identischen geben musste. Aus diesem Vorwissen heraus hätte auch ein Vergleich der 74 unterschiedlichen Ig1-Domänen, die beim Vergleich der 98 Ig1-Domänen als unterschiedliche herauskamen, mit den 48 unterschiedlichen Ig1-Domänen des Huhns der Linie R11 gelangt. Auch hätte man diese Menge noch um die 3 Ig1-Domänen, die sicher identisch waren zwischen M11 und R11 (s. 5.5.1.) kürzen können. Zur besseren Übersicht aber wurde der Vergleich mit den 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 und der 71 Ig1-Domänen der 71 Unterschiedlichen des Huhns der Linie R11 durchgeführt und abgebildet. Aus der Abbildung sind auch die Daten der Vergleiche innerhalb der beiden Hühnerlinien (s. 5.3.6. und 5.4.5.) ersichtlich.

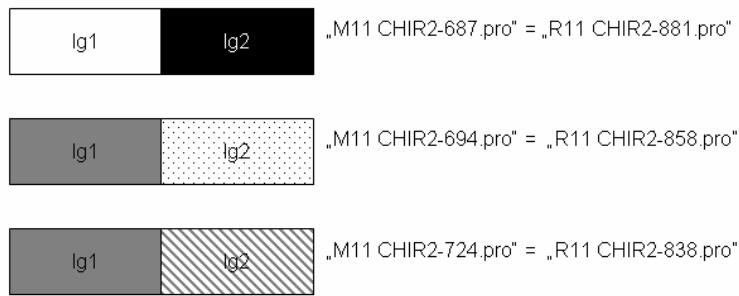
Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in Abbildung 35 zu sehen. Es ergaben sich 67 Identische in 17 Gruppen und 119 unterschiedliche Sequenzen. Die 17 Gruppen wurden gebildet aus 7 Gruppen mit je 2 Identischen, 2 Gruppen mit 3 Identischen, 1 Gruppe à 4, 3 Gruppen à 5 identischen Sequenzen, 2 Gruppen mit 6 identischen und 2 Gruppen mit 8 identischen Sequenzen. Somit konnten die 119 unterschiedlichen unterteilt werden in 102 Einzelsequenzen und 17 Gruppenrepräsentanten. Da dies das Ergebnis des Vergleichs der 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 mit den 71 Ig1-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie R11 ist, ist zu bedenken, dass die 102 Einzelsequenzen der Ig1-Domänen im gesamten betrachtet, also bei der Betrachtung der 142 Ig1-Domänen der 142 gefundenen Proteinsequenzen des

Huhns der Linie M11 mit den 117 Ig1-Domänen der 117 gefundenen Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11, nicht unbedingt alles Einzelsequenzen sind, da einige von ihnen ja identische Sequenzen innerhalb der 142 full-length-Proteinsequenzen von M11 bzw. innerhalb der 117 full-length-Proteinsequenzen von R11 besitzen, diese allerdings zur Generierung der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 bzw. der 71 unterschiedlichen des Huhns der Linie R11 entfernt wurden und so in dem Vergleich der 98 M11-Ig1-Domänen mit den 71 R11-Ig1-Domänen nicht mehr auftauchen.

Zwischen den beiden Hühnerlinien ist die Ig1-Domäne von „M11 CHIR2-724“ mit der von „R11 CHIR2-838“ identisch, die Ig1-Domäne von „M11 CHIR2-694“ mit der von „R11 CHIR2-858“ und die Ig1-Domäne von „M11 CHIR2-687“ mit der von „R11 CHIR2-881.“ Dies sind die 3 Sequenzen, die auch in der Gesamtlänge (Ig1+Ig2) identisch sind. Allerdings sind auch die Ig1-Domänen „M11 CHIR2-724\_Ig1.pro“/ „R11 CHIR2-838\_Ig1.pro“ und „M11 CHIR2-694\_Ig1.pro“ / „R11 CHIR2-858\_Ig1.pro“ untereinander identisch.

Dies bedeutet, dass die – in Gesamtlänge unterschiedlichen – Proteinsequenzen von „M11 CHIR2-724“ (ist identisch mit der Sequenz von „R11 CHIR2-838“) und „M11 CHIR2-694“ (ist identisch mit der Sequenz von „R11 CHIR2-858“) die gleiche Ig1-Domäne besitzen, sich also nur in ihrer Ig2-Domäne unterscheiden. Dies ist insofern ein wichtiges Ergebnis, da dies 2 der 3 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen sind, die zwischen M11 und R11 identisch sind. Das bedeutet, dass die 3 zwischen M11 und R11 identischen Sequenzen nur aus 2 verschiedenen Ig1-Domänen bestehen (s. Abbildung 22).

Nur noch eine weitere Ig1-Domäne kommt sowohl in M11 als auch in R11 vor. Dies ist die von „M11 CHIR2-765“ bzw. von „R11 CHIR2-830“, „R11 CHIR2-988“, „R11 CHIR2-879“. Diese Ig1-Domäne kommt in 4 - auf Gesamtebene unterschiedlichen – Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen vor, paart sich also mit 4 verschiedenen Ig2-Domänen.



**Abbildung 22: Darstellung der Zusammensetzung aus Ig1- und Ig2-Domäne bei den 3 - zwischen M11 und R11 - identischen Sequenzen**

Die Sequenz von „M11 CHIR2-687.pro“ ist mit der von „R11 CHIR2-881.pro“ identisch, die von „M11 CHIR2-694.pro“ mit der von „R11 CHIR2-858.pro“ und die Sequenz „M11 CHIR2-724.pro“ mit „R11 CHIR2-838.pro“. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass 2 der 3 zwischen M11 und R11 identischen Sequenzen dieselbe Ig1-Domäne (grau ausgefüllt) besitzen. So kommt diese Ig1-Domäne sowohl in „M11 CHIR2-694.pro“/ „R11 CHIR2-858.pro“ als auch in „M11 CHIR2-724.pro“/ „R11 CHIR2-838.pro“ vor, paart sich allerdings jeweils mit einer anderen Ig2-Domäne (gepunktet bzw. schraffiert dargestellt).

#### 5.5.4. Vergleich der 98 Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11 mit den 71 Ig2-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen von R11: 127 Unterschiedliche, 64 Identische in 22 Gruppen

Das Vorgehen entspricht dem Vorgehen, das in 5.5.3. beschrieben ist. Die dort gemachten Vorbemerkungen zur Auswahl der in diesen Vergleich einzubeziehenden Ig1-Domänen gelten entsprechend für die Ig2-Domänen.

Der Vergleich der 98 Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 mit den 71 Ig2-Domänen der 71 unterschiedlichen R11-Proteinsequenzen ergab 127 unterschiedliche Sequenzen und 64 identische in 22 Gruppen. 105 Ig2-Domänen sind somit Einzelsequenzen und 22 haben eine oder mehrere identische Ig2-Sequenzen. Somit gibt es 22 Ig2-Domänen, die sich mit 2 oder mehr unterschiedlichen Ig1-Domänen paaren. Die größte Gruppe der Identischen umfasst 7 Mitglieder. Diese Sequenz der Ig2-Domäne paart sich mit 7 unterschiedlichen Ig1-Domänen. Daneben gibt es 2 Gruppen à 5 identische, 2 Gruppen à 4 identische Sequenzen, 5 Gruppen mit je 3 Identischen und 12 Gruppen mit je 2 identischen Sequenzen.

Zwischen den beiden Hühnerlinien ist die Ig2-Domäne von „M11 CHIR2-724“ mit der von „R11 CHIR2-838“ identisch, die Ig2-Domäne von „M11 CHIR2-694“ mit der von „R11 CHIR2-858“ und die Ig2-Domäne von „M11 CHIR2-687“ mit der von „R11 CHIR2-881.“ Dies sind die 3 Sequenzen, die auch in der Gesamtebene (=full-length =Ig1+Ig2) identisch sind. Zudem gibt es noch 2 weitere Ig2-Domänen, die zwischen M11 und R11 identisch sind: die Ig2-Domäne von „M11 CHIR2-698“ mit der von „R11 CHIR2-901“ und die von „M11 CHIR2-753“ mit der von „R11 CHIR2-879“. Der Vergleich ist in Abbildung 36 dargestellt.

Auch hier gilt das schon unter 5.5.3. Gesagte, dass dieser Vergleich ein Auszug aus den gesamt gefundenen Sequenzen (142 M11 und 117 R11) ist, da in diesem nur die 98 Ig2-Domänen der - aus dem Vergleich der 142 M11-Proteinsequenzen resultierenden - 98 unterschiedlichen M11-Proteinsequenzen mit den 71 Ig2-Domänen der – aus dem Vergleich der 117 R11-Proteinsequenzen resultierenden – 71 unterschiedlichen R11-Proteinsequenzen einbezogen sind. Daher gilt zu berücksichtigen, dass einige der als „Einzel-Ig2-Sequenzen“ bezeichneten Sequenzen durchaus identische Sequenzen haben auf der full-length-Ebene.

## **5.6. Ergebnisse der Untersuchungen am Huhn der Linie LSL**

Zum Vergleich der Sequenzen von R11 und M11 mit einem 3. Huhn einer anderen Linie wurde auf die – schon für die Generierung der Primer verwendeten – Sequenzen der BAC-Klone eines LSL-Huhns zurückgegriffen. Die Proteinsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie LSL wurden von Frau Dr. Viertböck zur Verfügung gestellt. Im Gegensatz zu den 46 auf DNA-Ebene zur Verfügung gestellten Sequenzen konnten diesmal allerdings 51 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie LSL zur Verfügung gestellt werden. Diese enthielten folgende 5 Proteinsequenzen mehr: „LSL CHIR2C4“, „LSL CHIR2C1“, „LSL CHIR2B15“, „LSL CHIR2B13“ und „LSL CHIR2A3“.

Anzumerken ist, dass es sich bei den BAC-Klonen um eine genomische Analyse handelte (s. 2.2.6.5.), in der vorliegenden Doktorarbeit aber die Situation in Hühnern der Linie M11 und R11 anhand der mRNA untersucht worden ist. Zudem beschäftigt sich diese Arbeit mit dem extrazellulären Teil der CHIRs mit 2 Ig-Domänen, die BAC-Klone enthalten zusätzlich noch die Information des restlichen Aufbaus des gesamten Rezeptors (Signalpeptid, Transmembrandomäne, intrazytoplasmatischer Teil) der CHIRs mit 2 Ig-Domänen im Huhn der Linie LSL.

### 5.6.1. Untersuchung der 51 Sequenzen auf Proteinebene: 50 Unterschiedliche, 1 Identische

Zur späteren Vergleichbarkeit der Daten aus dem LSL-Huhn aus den BAC-Klonen mit den Daten aus M11 und R11 wurden die DNA-Sequenzen der BAC-Klone in ihre Proteinsequenzen übersetzt und derselbe Bereich, der auch für die Untersuchungen der Daten von M11 und R11 herangezogen wurde, genommen. Dieser Bereich entspricht beinahe der gesamten Ig1- und Ig2-Domäne (s. 5.3.2. und 5.1.1.).

Zum Vergleich dieser so generierten 51 Proteinsequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie LSL wurden die Sequenzen in eine Exceltabelle eingefügt und dort wie unter 5.3.1. beschrieben auf ihre Identität getestet.

Der Vergleich dieser 51 Proteinsequenzen des Huhns der Linie erbrachte 50 unterschiedliche Proteinsequenzen. Nur eine Sequenz kam doppelt vor: „LSL CHIR2B9“ war mit „LSL CHIR2B11“ identisch.

### 5.6.2. Untersuchung der 1 doppelten Sequenz auf Nukleotidebene: auch auf Nukleotidebene identisch

Die beiden Nukleotidsequenzen im Bereich der Ig1- und Ig2-Domäne von „LSL CHIR2B9“ und „LSL CHIR2B11“ wurden in MegAlign verglichen.

Es zeigte sich, dass diese beiden Sequenzen auch auf Nukleotidebene in dem Bereich der Ig1- und Ig2-Domäne identisch waren (s. Abbildung 23).

|                         |  |     |
|-------------------------|--|-----|
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | TCCCTGCACCCAGCCAGGGGGTGTCCCTGGGGGACAATGTCACCCCTGCGCTGCCACCTGCCCCAGCCAGCTGCCTGGGT | 80  |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | TCCCTGCACCCAGCCAGGGGGTGTCCCTGGGGGACAATGTCACCCCTGCGCTGCCACCTGCCCCAGCCAGCTGCCTGGGT | 80  |
|                         | 90      100      110      120      130      140      150      160                |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | CTGGCTGTTCCAGGATGGACATTTGAGATCCTACAGGAACATGGACAAGAGGCAGGACATGGCTGAGTTCTTCTTGGTTC | 160 |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | CTGGCTGTTCCAGGATGGACATTTGAGATCCTACAGGAACATGGACAAGAGGCAGGACATGGCTGAGTTCTTCTTGGTTC | 160 |
|                         | 170      180      190      200      210      220      230      240               |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | ACTTAAAGCAGGAAGATGCAGTGCAGTATTGGTGTCCGTACGATAGAGTTGCGCCATGGGAAACATCAAATAAGAGTGAT | 240 |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | ACTTAAAGCAGGAAGATGCAGTGCAGTATTGGTGTCCGTACGATAGAGTTGCGCCATGGGAAACATCAAATAAGAGTGAT | 240 |
|                         | 250      260      270      280      290      300      310      320               |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | CCCGTACAGCTGGTGGTGACAGATCCAAGTTATCCCCACCTGGCATTTCCTGAAACCTGAGGAATGTGTGGATGTGGG   | 320 |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | CCCGTACAGCTGGTGGTGACAGATCCAAGTTATCCCCACCTGGCATTTCCTGAAACCTGAGGAATGTGTGGATGTGGG   | 320 |
|                         | 330      340      350      360      370      380      390      400               |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | GATGAATGTCACCATCCAGTGTGGAACAGGAACATGGGGGAACCATCTTCTGACACAAGGATGGGCACTCAGCCCCTG   | 400 |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | GATGAATGTCACCATCCAGTGTGGAACAGGAACATGGGGGAACCATCTTCTGACACAAGGATGGGCACTCAGCCCCTG   | 400 |
|                         | 410      420      430      440      450      460      470      480               |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | TCCAGCACCAGGACCCCGATGATGGGGGCACTGCCACCTTACCATCTTTGGGGTGACCCAGCTGACTCTGGCACCTAT   | 480 |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | TCCAGCACCAGGACCCCGATGATGGGGGCACTGCCACCTTACCATCTTTGGGGTGACCCAGCTGACTCTGGCACCTAT   | 480 |
|                         | 490      500      510      520      530      540                                 |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | AGGTGCTCCTACCGCATCGGGGGCTCCTACCTTCTGTCTCACCCCTTGGGGATAATGTGACCCTGGAA             | 549 |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | AGGTGCTCCTACCGCATCGGGGGCTCCTACCTTCTGTCTCACCCCTTGGGGATAATGTGACCCTGGAA             | 549 |

**Abbildung 23: Vergleich von „LSL-CHIR2-B9“ und „LSL CHIR2-B11“**

Die Sequenzen von „LSL CHIR2-B9“ und „LSL CHIR2-B11“ wurden in ihrem für die Ig1- und Ig2-Domäne kodierenden Bereich verglichen. In der Abbildung ist zu sehen, dass es keine unterschiedliche Base zwischen diesen beiden Nukleotidsequenzen in diesem Bereich gibt.

### 5.6.3. Untersuchung der 1 doppelten Sequenz auf Nukleotidebene in der gesamten Länge des Rezeptors: 2 unterschiedliche Sequenzen

Da die Nukleotidsequenzen der BAC-Klone in voller Länge der Rezeptoren vorlagen (s. 5.6.) wurde ein Vergleich der beiden Nukleotidsequenzen, die in ihrem Ig1- und Ig2-Bereich identisch waren, auf der gesamten Länge durchgeführt. Dies bedeutete, dass die Basen der Transmembrandomäne und der intrazytoplasmatischen Domäne mit in den Vergleich einbezogen wurden.

Das Ergebnis dieses Vergleichs ist in

Abbildung 24 dargestellt. Somit unterscheiden sich diese beiden CHIRs in ihrem intrazytoplasmatischen Teil in den ITIMs. Der Bereich der Ig1- und Ig2-Domäne ist aber – wie schon in Abbildung 23 gezeigt – identisch. Ebenso sind die Transmembrandomänen und die Exons für den kleinen zytoplasmatischen Bereich (zwischen der Transmembrandomäne und den ITIMs) identisch.

| Ig1- und Ig2-Domäne     |  |             |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------|--|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | TCCCTGCACCCAGCCAGGGGGTGTCCCTGGGGGACAATGTACCCCTGCGCTGCCACCTGCCCCAGCCAGCTGCCTGGGT 80   |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | TCCCTGCACCCAGCCAGGGGGTGTCCCTGGGGGACAATGTACCCCTGCGCTGCCACCTGCCCCAGCCAGCTGCCTGGGT 80   |             |     |     |     |     |     |     |
| Ig1- und Ig2-Domäne     |  |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 90 100 110 120 130 140 150 160   |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | CTGGCTGTTCCAGGATGGACATTTGAGATCCTACAGGAACATGGACAAGAGGCAGGACATGGCTGAGTTCTTCTTGGTTC 160 |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | CTGGCTGTTCCAGGATGGACATTTGAGATCCTACAGGAACATGGACAAGAGGCAGGACATGGCTGAGTTCTTCTTGGTTC 160 |             |     |     |     |     |     |     |
| Ig1- und Ig2-Domäne     |  |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 170 180 190 200 210 220 230 240  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | ACTTAAAGCAGGAAGATGCAGTGCAGTATTGGTGTCCGTTACGATAGAGTTGGCCATGGGAAACATCAAATAAGAGTGAT 240 |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | ACTTAAAGCAGGAAGATGCAGTGCAGTATTGGTGTCCGTTACGATAGAGTTGGCCATGGGAAACATCAAATAAGAGTGAT 240 |             |     |     |     |     |     |     |
| Ig1- und Ig2-Domäne     |  |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 250 260 270 280 290 300 310 320  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | CCCGTACAGCTGGTGGTGACAGATCCAAGTTATCCCCACCTGGCATTTCCTGAACCCCTGAGGAATGTGTGGATGTGGG 320  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | CCCGTACAGCTGGTGGTGACAGATCCAAGTTATCCCCACCTGGCATTTCCTGAACCCCTGAGGAATGTGTGGATGTGGG 320  |             |     |     |     |     |     |     |
| Ig1- und Ig2-Domäne     |  |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 330 340 350 360 370 380 390 400  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | GATGAATGTCACCATCCAGTGTGGAACCAAGACATGGGGGAACCATCTTCTGCAACAAGGATGGGCACTCAGCCCCTG 400   |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | GATGAATGTCACCATCCAGTGTGGAACCAAGACATGGGGGAACCATCTTCTGCAACAAGGATGGGCACTCAGCCCCTG 400   |             |     |     |     |     |     |     |
| Ig1- und Ig2-Domäne     |  |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 410 420 430 440 450 460 470 480  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | TCCAGCACCCAGGACCCCGATGATGGGGGCACTGCCACCTTACCATCTTTGGGGTGACCCAGCTGACTTGGCACCTAT 480   |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | TCCAGCACCCAGGACCCCGATGATGGGGGCACTGCCACCTTACCATCTTTGGGGTGACCCAGCTGACTTGGCACCTAT 480   |             |     |     |     |     |     |     |
| Ig1- und Ig2-Domäne     |  | Endteil Ig2 |     |     |     |     |     |     |
|                         | 490 500 510 520 530 540 550 560  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | AGGTGCTCCTACCGCATCGGGGGCTCCTACCTTCTGTCTCACCCTTGGGGATAATGTGACCTGGAAAGTGATTCCCAG 560   |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | AGGTGCTCCTACCGCATCGGGGGCTCCTACCTTCTGTCTCACCCTTGGGGATAATGTGACCTGGAAAGTGATTCCCAG 560   |             |     |     |     |     |     |     |
| Endteil Ig2             | TM   |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 570  | 580         | 590 | 600 | 610 | 620 | 630 | 640 |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | ACCTGCACCCCAAGGTGACAATGGGGGTGCCAGCAGGAACCTGGTGGCAGCAGTGGCGGGGGCTTTGCTGCTGCCATTG 640  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | ACCTGCACCCCAAGGTGACAATGGGGGTGCCAGCAGGAACCTGGTGGCAGCAGTGGCGGGGGCTTTGCTGCTGCCATTG 640  |             |     |     |     |     |     |     |
| TM                      |  |             |     |     |     |     |     | cy  |
|                         | 650  | 660         | 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | TCATCATCATCGTCTCTCCTCTCTTCTCCTTGTGTCTCAGAGAAGACGAATGCAGAGAGATGAGAGGCCTGGTGCC 720     |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | TCATCATCATCGTCTCTCCTCTCTTCTCCTTGTGTCTCAGAGAAGACGAATGCAGAGAGATGAGAGGCCTGGTGCC 720     |             |     |     |     |     |     |     |
| cy                      |  | ITIMs       |     |     |     |     |     |     |
|                         | 730  | 740         | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | ACCTCCAGAAGCCCTGAGGCCGTGCACCTCCAGGTGTCCCGGGTACAGTGGGGTCTGACCTATGCCAGCTGCAAGT 800     |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | ACCTCCAGAAGCCCTGAGGCCGTGCACCTCCAGGTGTCCCGGGTACAGTGGGGTCTGACCTATGCCAGCTGCAAGT 800     |             |     |     |     |     |     |     |
| ITIMs                   |  |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 810  | 820         | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | TGTGACCCAGCACACACCCCGCGGCTCTTCTACCACTCTGAACCCCATATCTACGCCAGGTGGGCACGCGGG 880         |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | TGTGACCCAGCACACACCCCGCGGCTCTTCTACCACTCTGAACCCCATATCTACGCCAGGTGGGCACGCGGG 880         |             |     |     |     |     |     |     |
| ITIMs                   |  |             |     |     |     |     |     |     |
|                         | 890  |             |     |     |     |     |     |     |
| LSL CHIR2-B9 nucleotid  | GACCCCGCTGA  |             |     |     |     |     |     | 891 |
| LSL CHIR2-B11 nucleotid | GACCCCGCTGA  |             |     |     |     |     |     | 891 |

**Abbildung 24: Vergleich von „LSL CHIR2-B9“ und „LSL CHIR2-B11“ in voller Länge**

Die Nukleotidsequenzen der beiden Rezeptoren wurden in ihrer vollen Länge – ausschließlich der Sequenzen des Signalpeptids – verglichen. Dies bedeutet, dass neben den – schon in Abbildung 23 dargestellten – Sequenzen der Ig1- und Ig2-Domäne, auch die der Transmembrandomäne („TM“), der kurzen cytoplasmatischen Domäne („cy“) und des zytoplasmatischen Bereichs mit den beiden ITIMs (die zytoplasmatische Domäne ist kurz als „ITIMs“ bezeichnet) verglichen worden sind. Die Beschriftung „Ig1- und Ig2-Domäne“ kennzeichnet den Bereich, der zum Vergleich der Daten des LSL-Huhns mit den Daten des M11- und R11-Huhns herangezogen worden ist. Dieser Bereich entspricht beinahe der gesamten Ig1- und Ig2-Domäne, allerdings fehlen am Ende der Ig2-Domäne – aufgrund des Primerdesigns (s. 5.1.1.) – 6 bp. Zusätzlich wurde zum Vergleich die Primersequenz weggelassen (18 bp). Somit ergibt sich ein 24 bp langer Bereich, der mit „Endteil Ig2“ beschriftet ist. In der Abbildung 10 sind 7 bp zu sehen, die aufgrund des Primerdesigns nicht mit verglichen wurden, allerdings ist dort die genomische Sequenz abgebildet. Aufgrund der Phase 1 des Exons wird in dieser Abbildung die letzte Base des Exons für die Ig2-Domäne zur Transmembrandomäne gerechnet.

Die beiden Sequenzen unterscheiden sich in 5 bp (schwarz hinterlegt) in ihrem zytoplasmatischen Bereich.

**5.7. Vergleich der Daten von M11 und R11 mit den Daten von LSL**

**5.7.1. Vergleich der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von M11 und der 71 unterschiedlichen von R11 mit den 50 unterschiedlichen von LSL:**

- 1 Identischer zwischen allen 3 Hühnerlinien,
- 2 Identische zwischen M11 und LSL

Die 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 (s. 5.3.2.) und die 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11 (s. 5.4.2.) wurden mit den 50 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie LSL (s. 5.6.1.) mit Hilfe einer Exceltabelle verglichen.

Eine einzige Sequenz war zwischen allen 3 Hühnerlinien auf Proteinebene identisch. Dies war die Sequenz von „LSL CHIR2-A5.pro“/“M11 CHIR2-724.pro“/“R11 CHIR2-838.pro“. 2 weitere Sequenzen waren nur zwischen M11 und LSL identisch: dies waren zum einen „LSL CHIR2-A22.pro“ mit „M11 CHIR2-780.pro“ und zum anderen „LSL CHIR2-B2“ mit „M11 CHIR2-705.pro“. Daneben gab es natürlich noch die 3 Sequenzen, die zwischen M11 und R11 identisch waren, wovon allerdings eine (M11 CHIR2-724.pro“/“R11 CHIR2-838.pro“) nun auch noch – wie oben beschrieben -



identisch mit einer LSL-Sequenz war. Somit ergaben sich 5 Sequenzen, die zwischen unterschiedlichen Hühnerlinien identisch waren (s. Tabelle 4).

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| LSL CHIR2-A22.pro | } | Identisch |
| M11 CHIR2-780.pro |   |           |
| LSL CHIR2-B2.pro  | } | Identisch |
| M11 CHIR2-705.pro |   |           |
| M11 CHIR2-687.pro | } | Identisch |
| R11 CHIR2-881.pro |   |           |
| M11 CHIR2-694.pro | } | Identisch |
| R11 CHIR2-858.pro |   |           |
| LSL CHIR2-A5.pro  | } | Identisch |
| M11 CHIR2-724.pro |   |           |
| R11 CHIR2-838.pro |   |           |

**Tabelle 4: Darstellung der 5 identischen Sequenzen zwischen unterschiedlichen Hühnerlinien**

Die 11 Sequenzen, die zwischen unterschiedlichen Hühnerlinien identisch sind, sind in der Tabelle zusammen mit ihrer/ihren identischen Sequenz(en) aufgelistet. Somit ergeben sich insgesamt 4 Sequenzen, die zwischen 2 verschiedenen Hühnerlinien identisch sind und 1, die in allen 3 Hühnerlinien vorkommt.

#### 5.7.2. Vergleich der – auf Proteinebene zwischen M11 und LSL bzw. zwischen allen 3 Hühnerlinien - identischen Sequenzen auf Nukleotidebene

Die Sequenzen, die auf Proteinebene zwischen M11 und LSL identisch waren bzw. zwischen allen 3 Hühnerlinien identisch waren, waren auch jeweils auf Nukleotidebene identisch.

### 5.8. 23 CHIR-Konstrukte

#### 5.8.1. Auswahl von 23 repräsentativen Sequenzen

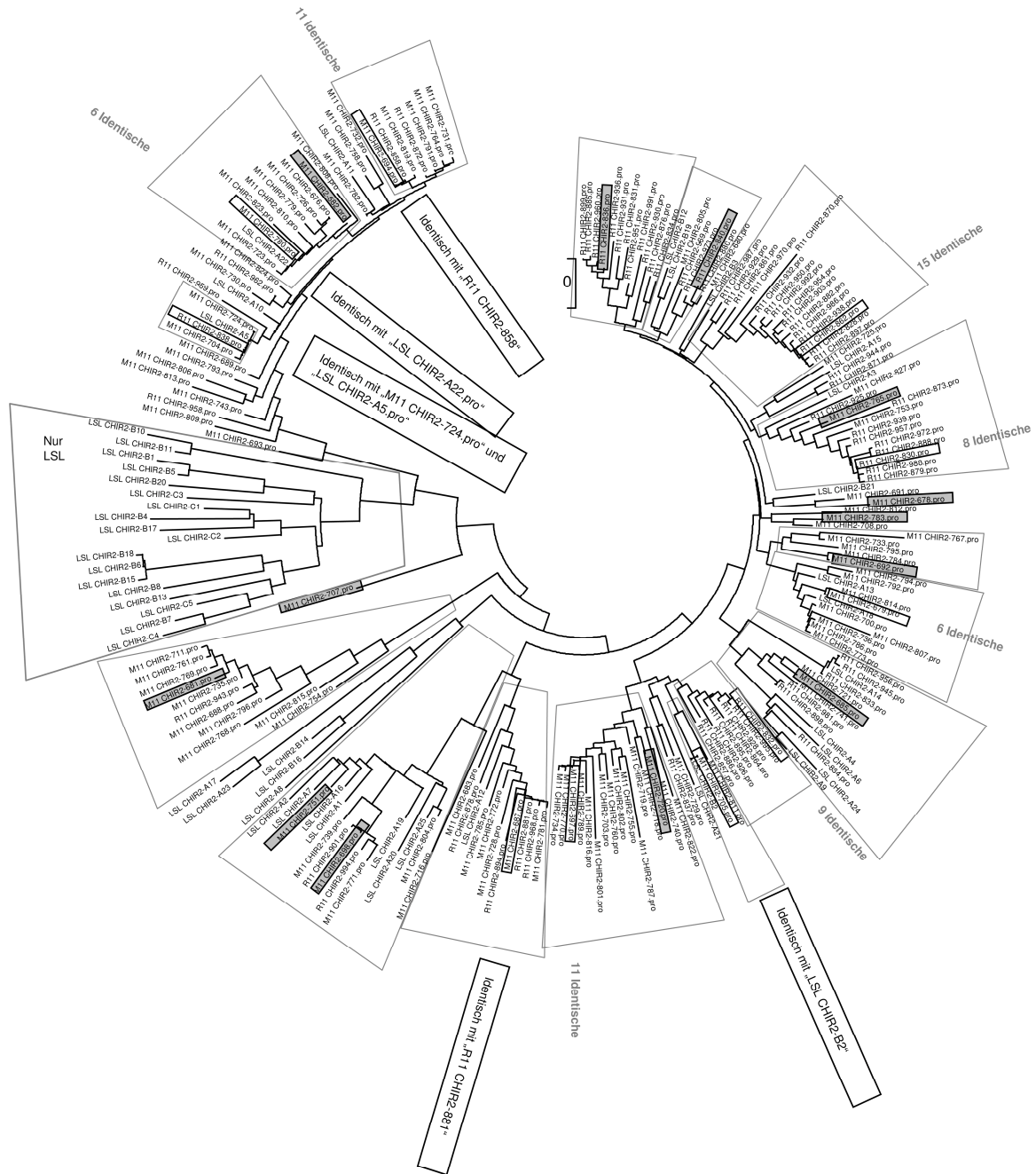
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Herstellung von CHIR-Konstrukten zur Ligandensuche mit Hilfe von BWZ.36-Zellen. Aufgrund der Fülle der gefundenen CHIRs mit 2 Ig-Domänen musste eine Auswahl getroffen werden. Hierfür wurden die Ergebnisse der bisher beschriebenen Untersuchungen mit einbezogen: Zum einen wurden die CHIRs mit 2 Ig-Domänen als Rezeptoren für die Ligandensuche

ausgewählt, die in mehreren Hühnerlinien vorkamen, zum anderen diejenigen, die 6 oder mehr identische Proteinsequenzen innerhalb einer Hühnerlinien hatten (s. Abbildung 29 und Abbildung 32). Somit ergaben sich 10 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen, die als repräsentative Rezeptoren für die Ligandensuche dienen sollten (s. Abbildung 25). Da dies aber im Vergleich zu 166 zur Verfügung stehenden unterschiedlichen Proteinsequenzen (98 unterschiedliche Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 plus 71 unterschiedliche Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11 minus der 3 identischen zwischen diesen beiden Hühnerlinien) bzw. im Vergleich zu 219 für den Vergleich herangezogenen Proteinsequenzen (98 unterschiedliche M11, 71 unterschiedliche R11, 50 unterschiedliche LSL) zu wenige repräsentative Sequenzen waren wurde ein Vergleich der 219 Proteinsequenzen mit Hilfe eines phylogenetischen Baums durchgeführt. Dieser diente dazu, die 219 Sequenzen in Gruppen mit ähnlichen/näher verwandten Mitgliedern einzuteilen und anhand dieser Gruppen weitere repräsentative Sequenzen zu bestimmen. Der Baum wurde mit dem Programm MEGA4 erstellt. Zuerst wurden Gruppen gesetzt anhand möglichst großer Äste (s. Abbildung 25). Danach wurden die 10 repräsentativen Sequenzen (s. oben) markiert. Weitere repräsentative Sequenzen wurden so gewählt, dass möglichst von jedem größeren Ast des Baums mindestens eine Sequenz ausgewählt wurde.

Aus den Voruntersuchungen bezüglich des Vorkommens einer Rezeptorsequenz in Hühnern unterschiedlicher Linien ergaben sich die 5 repräsentativen Rezeptoren: „M11 CHIR2-694.pro, M11 CHIR2-780.pro, R11 CHIR2-838.pro, M11 CHIR2-687.pro und M11 CHIR2-705.pro“. Es gab 7 Sequenzen, die 6 Mal oder mehr als 6 Mal in einer Hühnerlinie vorkamen: Dies waren die Sequenzen von „M11 CHIR2-694.pro, M11 CHIR2-780.pro, M11 CHIR2-697.pro, R11 CHIR2-832.pro, M11 CHIR2-679.pro, R11 CHIR2-830.pro und R11 CHIR2-862.pro“. Da „M11 CHIR2-694.pro“ und „M11 CHIR2-780.pro“ schon aufgrund ihres Vorkommens in unterschiedlichen Hühnerlinien als repräsentative Sequenzen ausgewählt worden waren, ergab dieses Kriterium der mehrfach vorhandenen Sequenzen nur 5 zusätzliche repräsentative Sequenzen.

Zur Abdeckung aller größeren Äste des Baums wurden – zu den aus den Voruntersuchungen resultierenden 10 Sequenzen – 13 weitere repräsentative Sequenzen ausgewählt. Diese sind der Abbildung 25 zu entnehmen und waren: „R11 CHIR2-836.pro, R11 CHIR2-840.pro, M11 CHIR2-765.pro, M11 CHIR2-678.pro, M11

CHIR2-783.pro, M11 CHIR2-692.pro, M11 CHIR2-685.pro, M11 CHIR2-720.pro, M11 CHIR2-698.pro, M11 CHIR2-751, M11 CHIR2-681.pro und M11 CHIR2-682.pro“.



**Abbildung 25: Phylogenetischer Baum der 98 unterschiedlichen M11-Proteinsequenzen mit den 71 unterschiedlichen R11-Proteinsequenzen und den 50 unterschiedlichen LSL-Proteinsequenzen**

Der Baum wurde mit Hilfe des Programms MEGA4 hergestellt und enthält alle - in einer Hühnerlinie unterschiedlichen - Proteinsequenzen der 3 Hühnerlinien. Er diente der Identifizierung der 13 zusätzlichen repräsentativen Sequenzen. Hierfür wurden Sequenzen größerer Äste anhand eines Trapezoids in Gruppen zusammengefasst. Die 5 Sequenzen, die in unterschiedlichen Hühnerlinien

vorkamen, wurden hellgrau markiert und ihre identischen Sequenzen (diese identischen Sequenzen können auch aus dem Baum entnommen werden) neben diese geschrieben. Weiterhin wurden die Sequenzen, die innerhalb einer Hühnerlinie 6 Mal oder mehr als 6 Mal vorkamen ebenfalls hellgrau hinterlegt und die Anzahl der Identischen in die Abbildung neben diese Sequenz geschrieben. Danach wurden 12 weitere repräsentative Sequenzen so ausgewählt, dass aus jeder Gruppe mindestens eine repräsentative Sequenz stammte. „M11 CHIR2-707.pro“ wurde ausgewählt, da diese Sequenz abseits der anderen Sequenzen in keine Gruppe einzuordnen war. Diese 13 ausgewählten Sequenzen sind in der Abbildung grau hinterlegt. Aus der Gruppe mit der Kennzeichnung „ nur LSL“ wurde keine repräsentative Sequenz ausgewählt, da diese Sequenzen nicht als Plasmide vorhanden waren.

### 5.8.2. Charakterisierung der 23 repräsentativen Sequenzen: 194 oder 195 Aminosäuren lang, Identität zwischen 59,3 % und 99,5 %

Die 23 als Repräsentanten ausgewählten Proteinsequenzen wurden mit MegAlign verglichen und die Identitäten wurden über die Funktion „View Sequence Distances“ angezeigt. Im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen – bei denen die Proteinsequenzen ohne die Primersequenz verglichen wurde – fand diesmal ein Vergleich inklusive der Primersequenzen statt, da diese auch im exprimierten Rezeptor (s. 5.8.3.) enthalten ist.

22 der 23 ausgewählten Sequenzen hatten eine Länge von 195 Aminosäuren. „M11 CHIR2-679.pro“ war 194 Aminosäuren lang. Dieser Sequenz fehlte die Aminosäure an der Stelle 57 nach Beginn (s. Abbildung 26). Die Sequenz von „M11 CHIR2-681.pro“ hatte an dieser Stelle ebenfalls eine Lücke, allerdings besaß sie an Stelle 21 vom Ende aus gesehen als einzige Sequenz eine Aminosäure. Die Identitäten der 23 Sequenzen lagen zwischen 59,3 % und 99,5 %. 6 Sequenzen stammten aus dem Huhn der Linie R11, die restlichen 17 aus dem Huhn der Linie M11.

```
M11 CHIR2-678.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTFLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTKREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-679.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 79
M11 CHIR2-681.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTKREHAGRYWCQYRVSESE 79
M11 CHIR2-682.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-685.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTKREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-687.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTFLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTKREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-692.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-694.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-697.pro LPRPSSLHPSQGVSLANNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-698.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-705.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTKREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-707.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-720.pro LPRPSSLHPSQGVSLANNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-751.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-765.pro LPRPSSLHPSQGVSGDPVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-780.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
M11 CHIR2-783.pro LPRPSSLHPSQGVSLANNVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
R11 CHIR2-830.pro LPRPSSLHPSQGVSGDPVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
R11 CHIR2-832.pro LPRPSSLHPSQGVSLQDAVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
R11 CHIR2-836.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDPVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
R11 CHIR2-838.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
R11 CHIR2-840.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDTVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
R11 CHIR2-862.pro LPRPSSLHPSQGVSLGDPVTLRCHLPRLAAWVWLYQEGAWSYNKGKKKQNTAEFFVSTLREHAGRYWCQYRVSESE 80
```

```
90 100 110 120 130 140 150 160
M11 CHIR2-678.pro VSMKSDPVELVLTDRNFPPEHISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-679.pro ASEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 159
M11 CHIR2-681.pro TSEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 159
M11 CHIR2-682.pro VSEKSVBELVWTDHRYSPENISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-685.pro ASEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-687.pro VSMKSDPVELVLTDRNFPPEHISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-692.pro ASEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-694.pro VSEKSVBELVWTDHRYSPENISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-697.pro ASEKSDPVELVLTDRSFPPEHISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-698.pro ISVMSDDPVELVLTDRSLLPPEHISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-705.pro ASEKSDPVELVLTDRSFPPEHISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-707.pro ASEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-720.pro VSMKSDPVELVLTDRSFPPEHISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-751.pro VSMKSDPVELVLTDRSFPPEHISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-765.pro VSEKSVBELVWTDHRYSPENISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-780.pro VSEKSVBELVWTDHRYSPENISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
M11 CHIR2-783.pro ASEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
R11 CHIR2-830.pro VSEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
R11 CHIR2-832.pro ASEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
R11 CHIR2-836.pro VSEKSVBELVWTDHRYSPENISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
R11 CHIR2-838.pro VSEKSVBELVWTDHRYSPENISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
R11 CHIR2-840.pro VSMKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
R11 CHIR2-862.pro VSEKSDPVELVLTDRYPPSRISLHPQHVGTGNTVIRCNWKDYGATFLLHKDGSSDPLKHNSSGGGTATFTLFGVTP 160
```

```
170 180 190
M11 CHIR2-678.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-679.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 194
M11 CHIR2-681.pro TENGTYRCSYLKGEFPLLSPLGDNVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-682.pro ADSGTYRCSYHEKAS-LVWSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-685.pro ADSGTYRCSYHRRGY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-687.pro ADSGTYRCSYRPNKY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-692.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-694.pro ADSGTYRCSYHEKAS-LVWSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-697.pro ADSGTYRCSYRPRGY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-698.pro ADSGTYRCSYRPNKY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-705.pro ADSGTYRCSYRPRGY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-707.pro ADSGTYRCSYRPRGY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-720.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-751.pro ADSGTYRCSYHTKKY-SPLSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-765.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-780.pro ADSGTYRCSYHEKAS-LVWSSPLGDSVLEVTPTPA 195
M11 CHIR2-783.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 195
R11 CHIR2-830.pro ADSGTYRCSYRPNKY-SPLSSPLGDSVLEVTPTPA 195
R11 CHIR2-832.pro ADSGTYRCSYRPRGY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
R11 CHIR2-836.pro ADSGTYRCSYRPRGY-PELSSPLGDSVLEVTPTPA 195
R11 CHIR2-838.pro ADSGTYRCSYHEKAS-LVWSSPLGDSVLEVTPTPA 195
R11 CHIR2-840.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 195
R11 CHIR2-862.pro ADSGTYRCSYRPRWY-ARMSSPLGDSVLEVTPTPA 195
```

| Percent Identity |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                   |                   |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------------|-------------------|
|                  | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19   | 20   | 21   | 22   | 23   |                   |                   |
| 1                | █    | 88.1 | 63.9 | 64.6 | 80.5 | 87.2 | 87.2 | 64.1 | 81.5 | 70.3 | 83.1 | 73.8 | 83.6 | 72.8 | 83.6 | 64.1 | 83.6 | 81.5 | 83.6 | 85.6 | 65.1 | 85.6 | 82.1 | 1                 | M11 CHIR2-678.pro |
| 2                | 12.9 | █    | 56.0 | 62.9 | 85.1 | 76.3 | 92.3 | 62.4 | 82.0 | 70.6 | 80.9 | 76.3 | 84.0 | 71.1 | 85.6 | 62.4 | 87.1 | 83.5 | 83.5 | 86.1 | 63.4 | 85.6 | 84.5 | 2                 | M11 CHIR2-679.pro |
| 3                | 48.9 | 45.2 | █    | 61.9 | 64.4 | 64.9 | 63.9 | 60.3 | 65.5 | 60.8 | 66.5 | 62.4 | 62.9 | 61.9 | 61.3 | 62.4 | 63.4 | 66.5 | 65.5 | 89.5 | 65.5 | 63.4 | 3    | M11 CHIR2-681.pro |                   |
| 4                | 47.6 | 50.9 | 52.9 | █    | 64.6 | 64.1 | 64.1 | 96.4 | 63.1 | 60.5 | 64.1 | 76.4 | 62.6 | 62.1 | 63.6 | 89.5 | 64.1 | 66.2 | 63.6 | 64.1 | 96.9 | 65.1 | 64.1 | 4                 | M11 CHIR2-682.pro |
| 5                | 22.6 | 16.7 | 48.0 | 47.6 | █    | 75.9 | 85.1 | 64.6 | 83.1 | 69.2 | 81.5 | 84.6 | 81.0 | 70.3 | 80.0 | 64.1 | 84.6 | 82.6 | 83.6 | 83.6 | 65.1 | 83.1 | 84.6 | 5                 | M11 CHIR2-685.pro |
| 6                | 14.1 | 28.5 | 47.0 | 48.6 | 29.1 | █    | 77.4 | 64.6 | 77.9 | 81.0 | 80.5 | 67.7 | 75.9 | 82.6 | 74.9 | 63.6 | 75.9 | 77.4 | 80.5 | 79.5 | 63.6 | 77.4 | 75.9 | 6                 | M11 CHIR2-687.pro |
| 7                | 14.1 | 8.2  | 48.9 | 48.6 | 16.6 | 26.9 | █    | 63.6 | 83.1 | 69.7 | 81.5 | 76.9 | 87.2 | 70.8 | 84.1 | 63.6 | 89.7 | 82.6 | 84.6 | 86.2 | 64.6 | 86.2 | 85.1 | 7                 | M11 CHIR2-692.pro |
| 8                | 48.6 | 51.9 | 55.9 | 3.7  | 47.6 | 47.6 | 49.5 | █    | 62.6 | 61.0 | 63.6 | 75.4 | 62.1 | 62.6 | 63.1 | 96.9 | 63.6 | 66.2 | 63.1 | 63.6 | 96.4 | 65.1 | 63.6 | 8                 | M11 CHIR2-694.pro |
| 9                | 21.2 | 20.7 | 46.1 | 50.5 | 19.2 | 26.2 | 19.2 | 51.5 | █    | 70.8 | 90.8 | 71.8 | 95.9 | 70.3 | 79.0 | 62.6 | 87.7 | 80.0 | 93.3 | 81.5 | 63.6 | 81.0 | 81.0 | 9                 | M11 CHIR2-697.pro |
| 10               | 37.9 | 37.3 | 54.9 | 55.5 | 39.5 | 21.9 | 38.7 | 54.5 | 37.0 | █    | 68.7 | 64.1 | 68.7 | 90.3 | 68.7 | 60.0 | 68.2 | 71.3 | 72.3 | 72.8 | 60.0 | 68.2 | 69.7 | 10                | M11 CHIR2-698.pro |
| 11               | 19.2 | 22.1 | 44.2 | 48.6 | 21.2 | 22.6 | 21.2 | 49.5 | 9.9  | 40.4 | █    | 72.8 | 86.7 | 70.3 | 77.9 | 63.6 | 82.6 | 79.0 | 93.3 | 81.0 | 64.1 | 81.5 | 80.5 | 11                | M11 CHIR2-705.pro |
| 12               | 32.2 | 28.5 | 51.9 | 28.4 | 17.3 | 42.2 | 27.6 | 29.9 | 35.4 | 48.6 | 33.8 | █    | 70.3 | 64.6 | 71.8 | 75.9 | 74.9 | 71.8 | 72.8 | 75.9 | 76.9 | 73.8 | 74.4 | 12                | M11 CHIR2-707.pro |
| 13               | 18.6 | 18.0 | 50.9 | 51.5 | 21.9 | 29.1 | 14.1 | 52.5 | 4.2  | 40.4 | 14.7 | 37.9 | █    | 69.2 | 81.0 | 62.1 | 90.8 | 79.5 | 89.2 | 80.5 | 63.1 | 83.1 | 82.6 | 13                | M11 CHIR2-720.pro |
| 14               | 33.8 | 36.4 | 52.9 | 52.5 | 37.9 | 19.9 | 37.0 | 51.5 | 37.9 | 10.5 | 37.9 | 47.6 | 39.5 | █    | 70.8 | 61.5 | 68.7 | 73.8 | 73.3 | 74.4 | 61.5 | 70.3 | 71.8 | 14                | M11 CHIR2-751.pro |
| 15               | 18.6 | 16.1 | 53.9 | 49.5 | 23.3 | 30.6 | 17.9 | 50.5 | 24.7 | 40.4 | 26.2 | 35.4 | 21.9 | 37.0 | █    | 63.1 | 87.2 | 95.9 | 79.5 | 86.7 | 64.1 | 89.2 | 86.2 | 15                | M11 CHIR2-765.pro |
| 16               | 48.6 | 51.9 | 53.9 | 0.5  | 48.6 | 49.5 | 49.5 | 3.1  | 51.5 | 56.6 | 49.5 | 29.1 | 52.5 | 53.5 | 50.5 | █    | 63.6 | 65.6 | 63.1 | 63.6 | 97.4 | 64.6 | 63.6 | 16                | M11 CHIR2-780.pro |
| 17               | 18.6 | 14.2 | 51.9 | 48.6 | 17.3 | 29.1 | 11.1 | 49.5 | 13.5 | 41.3 | 19.9 | 30.6 | 9.9  | 40.4 | 14.1 | 49.5 | █    | 84.1 | 85.1 | 85.1 | 64.6 | 89.2 | 88.2 | 17                | M11 CHIR2-783.pro |
| 18               | 21.2 | 18.7 | 49.9 | 44.8 | 19.9 | 26.9 | 19.9 | 44.8 | 23.3 | 36.2 | 24.7 | 35.4 | 24.0 | 32.2 | 4.2  | 45.8 | 17.9 | █    | 80.5 | 85.6 | 66.7 | 85.1 | 84.6 | 18                | R11 CHIR2-830.pro |
| 19               | 18.6 | 18.7 | 44.2 | 49.5 | 18.6 | 22.6 | 17.3 | 50.5 | 7.0  | 34.6 | 7.0  | 33.8 | 11.7 | 33.0 | 24.0 | 50.5 | 16.6 | 22.6 | █    | 85.1 | 64.1 | 82.1 | 81.5 | 19                | R11 CHIR2-832.pro |
| 20               | 16.0 | 15.4 | 46.1 | 48.6 | 18.6 | 24.0 | 15.3 | 49.5 | 21.2 | 33.8 | 21.9 | 29.1 | 22.6 | 31.4 | 14.7 | 49.5 | 16.6 | 16.0 | 16.6 | █    | 64.6 | 87.2 | 86.7 | 20                | R11 CHIR2-836.pro |
| 21               | 46.7 | 49.9 | 58.1 | 3.1  | 46.7 | 49.5 | 47.6 | 3.7  | 49.5 | 56.6 | 48.6 | 27.6 | 50.5 | 53.5 | 48.6 | 2.6  | 47.6 | 43.9 | 48.6 | 47.6 | █    | 65.6 | 63.6 | 21                | R11 CHIR2-838.pro |
| 22               | 16.0 | 16.1 | 46.1 | 46.7 | 19.2 | 26.9 | 15.3 | 46.7 | 21.9 | 41.3 | 21.2 | 32.2 | 19.2 | 37.9 | 11.7 | 47.6 | 11.7 | 16.6 | 20.6 | 14.1 | 45.8 | █    | 86.2 | 22                | R11 CHIR2-840.pro |
| 23               | 20.6 | 17.4 | 49.9 | 48.6 | 17.3 | 29.1 | 16.6 | 49.5 | 21.9 | 38.7 | 22.6 | 31.4 | 19.9 | 35.4 | 15.3 | 49.5 | 12.9 | 17.3 | 21.2 | 14.7 | 49.5 | 15.3 | █    | 23                | R11 CHIR2-862.pro |

Abbildung 26: Vergleich und Identitäten der 23 ausgewählten repräsentativen Sequenzen

In dem Vergleich sind die 23 Proteinsequenzen der ausgewählten Rezeptoren dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Sequenz von „M11 CHIR2-679.pro“ mit 194 Aminosäuren die kürzeste Sequenz darstellt und dass der Grund dafür eine „Lücke“ an Position 57 nach Beginn ist. „M11 CHIR2-681.pro“ besitzt diese „Lücke“ ebenfalls, allerdings hat diese Sequenz eine Länge von 195 Aminosäuren, da sie an Position 21 von hinten her gezählt eine zusätzliche Aminosäure besitzt. Lücken im Vergleich sind als Gedankenstriche angegeben. Die weiß hinterlegten Aminosäuren sind Aminosäuren, die nicht der Consensussequenz entsprechen. Die Aminosäure der Consensussequenz an einer bestimmten Stelle ist diejenige Aminosäure, die in mehr als der Hälfte der Sequenzen an dieser Stelle identisch ist.

Im unteren Teil der Abbildung sind die Identitäten zwischen den 23 Sequenzen wieder gegeben. Der niedrigste (59,3 %) und der höchste Wert (99,5 %) sind grau hinterlegt.

### 5.8.3. Herstellung von CHIR-Konstrukten

Nur 2 der 23 repräsentativen Sequenzen lagen schon in Verbindung mit dem Zeta-Vektor vor: „R11 CHIR2-838“ und „R11 CHIR2-840“. Die restlichen 21 lagen noch nicht im Zeta-Vektor vor, da sie ursprünglich in den Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO® kloniert worden sind (s. 5.3.1. und 5.4.1.). Daher mussten diese 21 zuerst aus dem pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor ausgeschnitten werden und mit dem Zeta-Vektor ligiert werden. Dies war möglich aufgrund der 2 EcoRI-Schnittstellen, die sich - aufgrund der Primer 1253 und 1254 (s. 5.1.1.) - am Anfang und Ende der CHIRs mit 2 Ig-Domänen befanden. Nach EcoRI-Verdau des Plasmids, welches aus dem pcDNA3.1/V5-His-TOPO® Vektor mit entsprechender repräsentativer Sequenz

bestand, wurde eine Gelelektrophorese des Verdau durchgeführt. Die Bande bei einer Länge von ca. 600 bp (s. 5.3.1.) wurde ausgeschnitten, mit dem Zeta-Vektor ligiert und in chemisch kompetente TOP10 E. coli transformiert. Am nächsten Tag wurde eine Richtungs-PCR mit den Primern 742 und 1254 durchgeführt, um zu sehen, welche Bakterienkolonie ein Insert in der richtigen Orientierung besaß. Nach Färbung des Gels und Sichtbarmachung der Banden wurde eine Kolonie mit dem richtig orientierten Insert (Bande bei ca. 700 bp s. 5.4.1.) ausgewählt und diese mittels einer Nachtkultur (s. 4.13.1.2.) vermehrt. Am darauf folgenden Tag wurde ein MiniPrep durchgeführt und somit das Plasmid erhalten, welches aus dem Zeta-Vektor und dem entsprechenden CHIR mit 2 Ig-Domänen bestand.

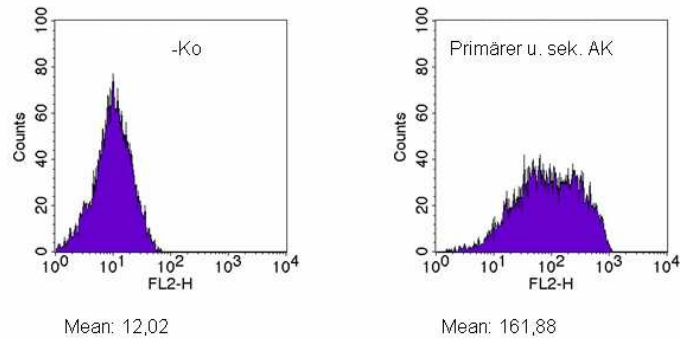
Zur Überprüfung der 21 umklonierten repräsentativen Sequenzen wurde das Plasmid (Zeta-Vektor mit dem entsprechenden CHIR mit 2 Ig-Domänen) durch GATC sequenziert.

#### 5.8.4. Testtransfektion

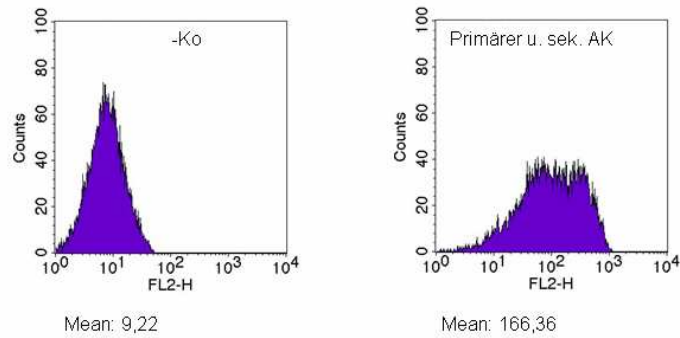
Vor der Herstellung der 23 stabil transfizierten Zelllinien wurde die Exprimierbarkeit der 23 CHIR-Konstrukte mit Hilfe einer Testtransfektion von 293T-Zellen (s. 4.16.1.2.) mit diesen 23 verschiedenen Plasmiden mit anschließender Analyse der transfizierten Zellen im Durchflusszytometer überprüft. Als primärer Antikörper wurde der anti-FLAG-Antikörper „Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody“ verwendet, als sekundärer Antikörper der PE-markierte „Goat anti-mouse IgG<sub>3</sub>-PE“. Nur bei „M11 CHIR2-707“-zeta in 293T-Zellen wurde als sekundärer Antikörper „Goat anti-mouse Ig (H + L) – FITC“ verwendet, da dieses Konstrukt zu einem anderen Zeitpunkt getestet worden ist.

Alle 23 CHIR-Konstrukte konnten in 293T-Zellen exprimiert werden. In Abbildung 27 sind die Daten der durchflusszytometrischen Analyse der Testtransfektion der 23 verschiedenen CHIR-Konstrukte gezeigt.

„M11 CHIR2-681“-zeta



„R11 CHIR2-838“-zeta



|                      | Mean -Ko | Mean primärer und sekundärer AK |
|----------------------|----------|---------------------------------|
| "M11 CHIR2-678"-zeta | 8,41     | 42,17                           |
| "M11 CHIR2-679"-zeta | 8,09     | 56,86                           |
| "M11 CHIR2-682"-zeta | 10,65    | 180,72                          |
| "M11 CHIR2-685"-zeta | 7,32     | 35,51                           |
| "M11 CHIR2-687"-zeta | 11,7     | 148,06                          |
| "M11 CHIR2-692"-zeta | 7,18     | 50,98                           |
| "M11 CHIR2-694"-zeta | 11,15    | 37,31                           |
| "M11 CHIR2-697"-zeta | 8,89     | 68,53                           |
| "M11 CHIR2-698"-zeta | 11,97    | 162,81                          |
| "M11 CHIR2-705"-zeta | 7,5      | 61,21                           |
| "M11 CHIR2-707"-zeta | 3,71     | 51,57                           |
| "M11 CHIR2-720"-zeta | 7,99     | 45,03                           |
| "M11 CHIR2-751"-zeta | 8,25     | 112,01                          |
| "M11 CHIR2-765"-zeta | 12,69    | 118,66                          |
| "M11 CHIR2-780"-zeta | 11,25    | 60,79                           |
| "M11 CHIR2-783"-zeta | 8,69     | 56,54                           |
| "R11 CHIR2-830"-zeta | 9,91     | 61,01                           |
| "R11 CHIR2-832"-zeta | 9,47     | 46,68                           |
| "R11 CHIR2-836"-zeta | 8,52     | 21,02                           |
| "R11 CHIR2-840"-zeta | 10,85    | 35,63                           |
| "R11 CHIR2-862"-zeta | 8,99     | 34,96                           |



**Abbildung 27: Durchflusszytometrische Daten der Testtransfektion von 293T-Zellen mit 23 CHIR-Konstrukten**

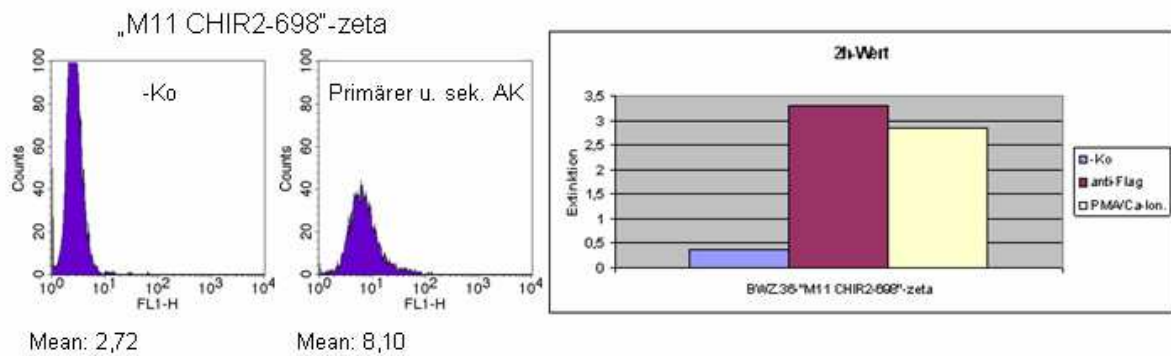
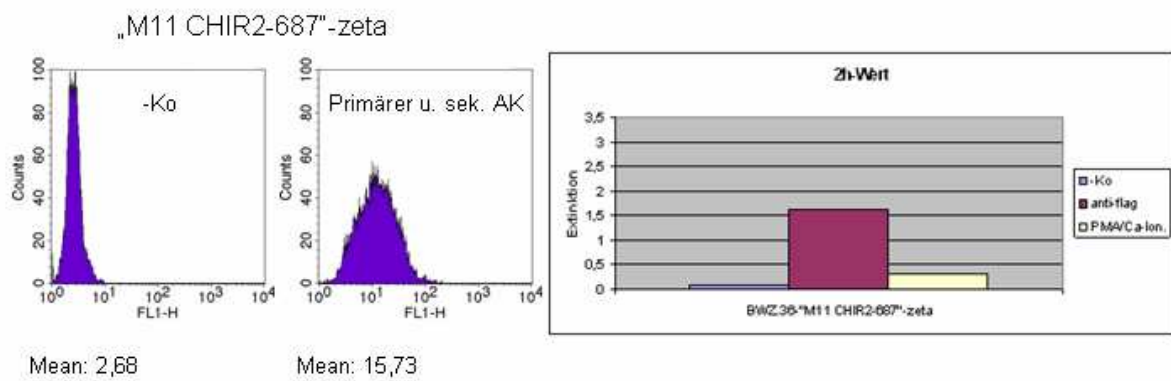
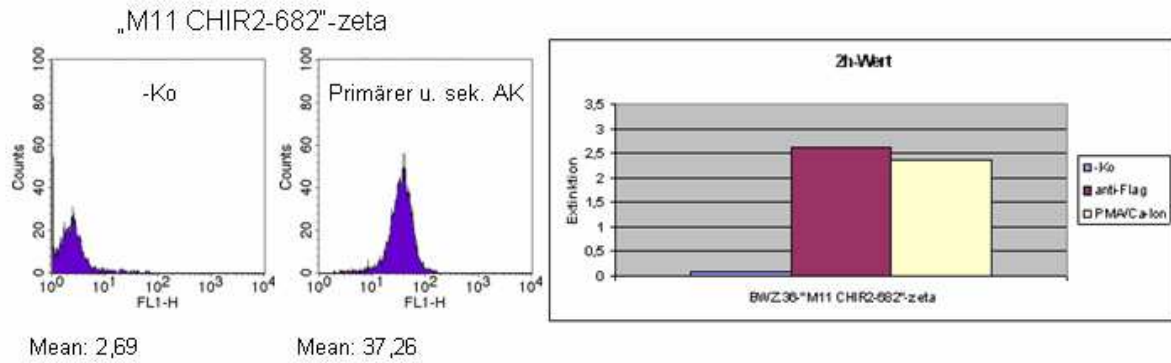
2 der 23 Testtransfektionen (die Testtransfektion mit dem CHIR-Konstrukt „M11 CHIR2-681“-zeta (obere 2 Bilder) bzw. mit „R11 CHIR2-838“-zeta (untere 2 Bilder)) sind als FACS-Bilder dargestellt. Auf jedem Bild ist auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität aufgetragen, auf der y-Achse die Anzahl der Zellen („Counts“). Die Negativkontrolle ist jeweils im linken Bild („-Ko“) dargestellt. In dieser wurde nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt. Das rechte Bild zeigt jeweils die Färbung mit dem primären anti-Flag-Antikörper (Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody) und dem sekundären, PE-markierten, Antikörper („Primärer u. sek. AK“). Der Wert der mittleren Fluoreszenzintensität („mean fluorescence intensity“, kurz „Mean“) ist unter der jeweiligen Abbildung angegeben.

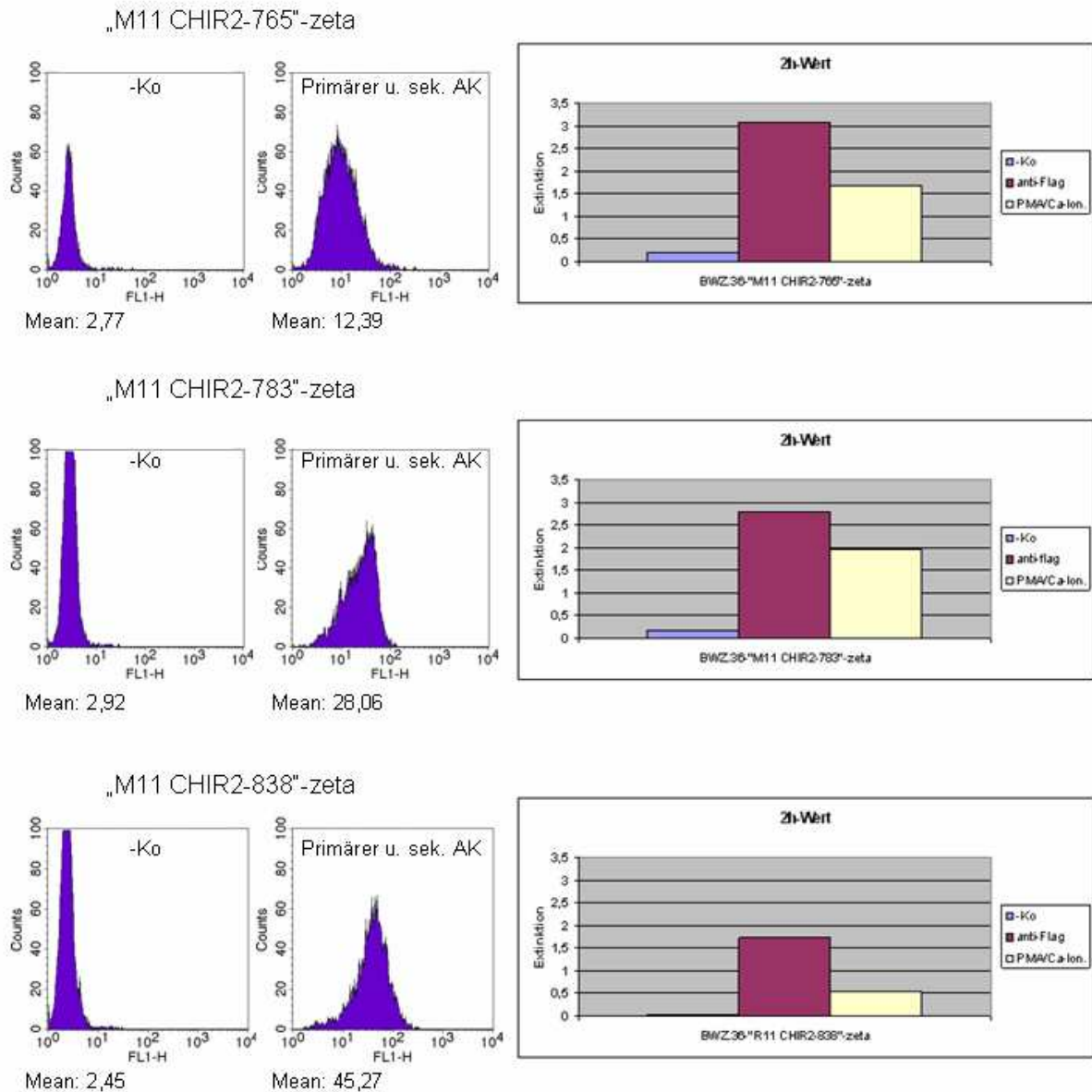
In der Tabelle sind die Werte der Testtransfektion der restlichen 21 CHIR-Konstrukte zu sehen.

**5.8.5. 6 stabile und funktionierende Zelllinien:  
status quo der geplanten 23 stabilen**

Die 23 repräsentativen Sequenzen sollten für die Ligandensuche für CHIRs mit 2 Ig-Domänen stabil in Zellen exprimiert werden. Da für die Ligandensuche der  $\beta$ -Galactosidase-Ansatz verwendet werden sollte (s. 4.17.) wurden BWZ.36-Zellen als zu transfizierende Zellart ausgewählt. Die Methode der Transfektion stellte die Elektroporation (s. 4.16.2.) dar. Jede einzelne repräsentative Sequenz wurde in Form des CHIR-Konstruktes, also in Verbindung mit dem Zeta-Vektor, in BWZ.36-Zellen transfiziert. Unter Selektionsdruck gewachsene Klone wurden zuerst in der Durchflusszytometrie (primärer Antikörper: „Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody“, sekundärer Antikörper: „Goat anti-mouse Ig (H + L) – FITC“), s. 4.19.) auf ihre Oberflächenexprimierbarkeit hin getestet. Waren sie in der Oberflächenexpression positiv wurden diese Klone im  $\beta$ -Galactosidase-Ansatz (s. 4.17. und Abbildung 8) hinsichtlich des Funktionierens der intrazellulären Signalkaskade und damit der Produktion der  $\beta$ -Galactosidase getestet.

Es konnten bis jetzt 6 stabile Zelllinien der 23 geplanten generiert werden. Diese sind die Zelllinien der CHIR-Konstrukte der Sequenzen „M11 CHIR2-682“, „M11 CHIR2-687“, „M11 CHIR2-698“, „M11 CHIR2-765“, „M11 CHIR2-783“ und „R11 CHIR2-838“. Alle diese Zelllinien ergaben bei mehrmaliger durchflusszytometrischer Analyse und zweimaliger Analyse im  $\beta$ -Galactosidase-Ansatz durchwegs positive Testergebnisse. In Abbildung 28 ist für jede stabile Zelllinie (BWZ.36-„M11 CHIR2-xxx“-zeta (das CHIR-Konstrukt von „M11 CHIR2-xxx“ in BWZ.36-Zellen) ein Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse und ein Ergebnis des 2 h-Wertes eines  $\beta$ -Galactosidase-Ansatzes abgebildet.





**Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse und  $\beta$ -Galactosidase-Ansatz der 6 stabilen Zelllinien**

Für jede der 6 stabilen Zelllinien ist ein Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse und ein Ergebnis des 2 h-Wertes eines  $\beta$ -Galactosidase-Ansatzes nebeneinander dargestellt.

In jedem der 12 FACS-Bilder ist auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität aufgetragen und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen („Counts“). Die Negativkontrolle der durchflusszytometrischen Analyse ist im jeweils linken der beiden FACS-Bilder dargestellt und mit „-Ko“ gekennzeichnet. Dieser fehlt der primäre Antikörper „anti-Flag“ (Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody) (s. 4.19.). Das jeweils rechte FACS-Bild zeigt die Färbung mit dem primären anti-Flag-Antikörper (Anti-FLAG-M2® Monoclonal Antibody) und dem sekundären, FITC-markierten, Antikörper und ist mit „primärer und sek. AK“ beschriftet. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist als „Mean“ jeweils unter dem entsprechenden Bild angegeben.

In der rechten Spalte sind die 2 h-Werte eines  $\beta$ -Galactosidase-Ansatzes der entsprechenden stabilen Zelllinie abgebildet (s. 4.17.).

## 6. Diskussion

### 6.1. Primerdesign

Um eine Aussage über die Variabilität der exprimierten CHIRs treffen zu können, fiel die Entscheidung auf die Untersuchung dieser bei CHIRs mit 2 Ig-Domänen (im extrazellulären Bereich). Die Entscheidung für die Lage des Primerpaars am Anfang der Ig1-Domäne und am Ende der Ig2-Domäne erscheint nicht nur aus dem Grund sinnvoll, dass die CHIR-Gene bei einem Huhn der Linie LSL auf genetischer Ebene eine größere Variabilität in den Genen für CHIRs mit 2 Ig-Domänen im Vergleich zu den Genen mit 1 Ig-Domäne zeigten, sondern auch aus dem Grund, dass eine Platzierung der Primer am Anfang und am Ende der Ig1-Domäne keine Aussage erlaubt hätte, ob die herausklonierten Ig1-Domänen aus Rezeptoren mit 1 (nur Ig1) oder 2 Ig-Domänen (Ig1 und Ig2) stammten. Ein derartiges Primerdesign hätte zwar eine Aussage über die Variabilität der Ig1-Domänen der CHIRs ermöglicht, aber eine derartige Aussage war auch anhand der in dieser Arbeit gewählten Primerlage möglich und zusätzlich war eine Aussage über die Variabilität der Ig2-Domäne möglich. Zudem wurde eine derartige Untersuchung schon von Viertlböck et al. [11] (s. auch 2.2.6.5.) durchgeführt, die mit einem Primerpaar, welches spezifisch war für die Ig1-Domäne von CHIRs über 100 Sequenzen aus einem einzigen Tier aus cDNA aus PBL klonieren konnten, von welchen 41 unterschiedlich waren. Das Problem dieses Ansatzes war, dass nicht klar war, wie viele dieser Sequenzen aus Rezeptoren mit 1 Ig-Domäne und wie viele dieser Sequenzen aus Rezeptoren mit 2 Ig-Domänen stammten.

Eine Platzierung der Primer am Anfang und am Ende der Ig2-Domäne hätte wahrscheinlich zu derselben Aussagemöglichkeit über die Variabilität der Expression von CHIRs mit 2 Ig-Domänen geführt wie die in dieser Arbeit gewählte Platzierung der Primer, da Nikolaidis et al. [10] die Vermutung äußerten, dass wenn nur eine Ig-Domäne vorhanden ist, diese die Ig1-Domäne ist. Somit wäre der Umkehrschluss, dass – wenn die 2. Ig-Domäne (Ig2) vorhanden ist – auch die erste Ig-Domäne (Ig1) vorhanden sein muss und es sich um einen Rezeptor mit den 2 Ig-Domänen Ig1 und Ig2 handeln muss, da bisher bei CHIRs keine Rezeptoren mit mehr als 2 extrazellulären Ig-Domänen identifiziert worden sind. Allerdings wäre bei dieser Platzierung der Primer keine Aussage über die Variabilität in der Ig1-Domäne bei CHIRs mit 2 Ig-Domänen möglich gewesen.

Somit erschien das Design des Sense-Primers am Anfang der Ig1-Domäne und des Antisense-Primers am Ende der Ig2-Domäne am vielversprechendsten hinsichtlich der Aussagen, die aus den klonierten Rezeptoren/extrazellulären Anteilen der Rezeptoren zu gewinnen waren.

Anzumerken ist, dass aufgrund dieses Primerdesigns in Kauf genommen wurde, dass Aussagen nur über die Variabilität des extrazellulären Teils von CHIRs mit 2 Ig-Domänen gewonnen werden konnten und nicht über die Variabilität von Rezeptortypen der CHIRs mit 2 extrazellulären Ig-Domänen, da der transmembrane Teil und der zytoplasmatische Teil nicht mit kloniert wurden. Allerdings stand dies nicht im Blickpunkt dieser Arbeit, da der Fokus hier auf die Variabilität des extrazellulären Anteils gelegt wurde, da dieser der für die Ligandenbindung allein verantwortliche Teil ist. Dieser Teil ist auch der für die Aussage über die Variabilität eigentlich bedeutsame, da es von der Funktion her nur 3 Rezeptortypen – hemmend, aktivierend oder bifunktionell – gibt, auch wenn sich diese – wie in 2.2.3. beschrieben - noch in dem detaillierteren Aufbau unterscheiden z.B. hinsichtlich der Motive, die sie in ihrem zytoplasmatischen Anteil tragen, der Kombinationen dieser und auch hinsichtlich der Art und Position der eventuellen positiv geladenen Aminosäure in ihrem transmembranen Bereich.

Die große Anzahl an verschiedenen CHIRs mit 2 Ig-Domänen, die aus 2 verschiedenen Hühnerlinien (s. 5.3.1. und 5.3.2.; 5.4.1. und 5.4.2.) mit Hilfe der entworfenen Primer kloniert werden konnte, spricht für das unter 5.1.1. genau beschriebene Vorgehen des Primerdesigns.

## **6.2. Ergebnisse der Klonierung**

### **6.2.1. Proteinebene**

#### **6.2.1.1. Ergebnisse der Untersuchungen der Proteinsequenzen auf Gesamtebene (Ig1+Ig2)**

Die Klonierung von 142 Sequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus einem Huhn der Linie M11 (s. 5.3.1.) und von 117 aus einem Huhn der Linie R11 (s. 5.4.1.) zeigt die enorme Menge von exprimierten Sequenzen dieser Rezeptorfamilie auf und lässt auf eine bedeutende Rolle dieser schließen. Die Identifikation von 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen innerhalb der 142 gefundenen M11-Sequenzen (s. 5.3.2.) bzw. von 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen innerhalb der 117 (s.

5.4.2.) gefundenen R11-Sequenzen unterstreicht diese Vermutung der bedeutenden Rolle und zeigt zudem deutlich die hohe Variabilität der CHIRs mit 2 Ig-Domänen innerhalb eines Tieres in den PBMCs. Anzumerken ist, dass diese enorme Variabilität in anderen Geweben wie z.B. der Milz sogar noch größer sein könnte. Die Identifikation von 3 Proteinsequenzen, die zwischen den beiden Hühnerlinien M11 und R11 identisch sind (s. 5.5.1.) zeigt eine Konservierung von bestimmten Rezeptoren zwischen unterschiedlichen Hühnerlinien. Auf der anderen Seite zeigt diese geringe Anzahl der zwischen den beiden Hühnerlinien „konservierten“ Rezeptoren im Vergleich zur Gesamtanzahl der verbleibenden unterschiedlichen Rezeptoren (163 Rezeptoren kommen jeweils nur in einer Hühnerlinie vor) die Variabilität dieser zwischen Hühnerlinien.

Die Identifizierung von mehrmals (14 Stück bei M11 s. 5.3.2. und 17 Stück bei R11 s. 5.4.2.) - und besonders von häufig ( $\geq 6$  Mal) - exprimierten Rezeptoren z.B. der Sequenz von „M11 CHIR2-697.pro“, die insgesamt 11 Mal aus ein und demselben Tier kloniert wurde (s. Abbildung 32 „7. Gruppe“) könnte entweder ein weiterer wichtiger Hinweis auf die Bedeutsamkeit dieses Rezeptors sein oder PCR-bedingt sein. Falls diese Identifizierung nicht methodisch bedingt ist, müssen die möglichen Ursachen für das Auffinden von mehreren mRNAs, die für dasselbe Protein kodierten, also für die mehrmalige Expression von einem Rezeptor abhängig davon diskutiert werden, ob die gefundenen mRNAs identisch waren oder sich unterschieden. Diese Punkte werden eingehend unter 6.2.2. diskutiert.

#### **6.2.1.2. Ergebnisse der Untersuchungen der getrennten Ig-Domänen**

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Ig1-Domänen bzw. der Ig2-Domänen (s. 5.3.6., 5.3.7., 5.4.5., 5.4.6., 5.5.3., 5.5.4.) zeigten eine gewisse Konservierung/Verringerung der Variabilität der CHIRs mit 2 Ig-Domänen (sowohl innerhalb einer Hühnerlinie als auch zwischen den Hühnerlinien) und zugleich einen Mechanismus, mit Hilfe dessen die CHIRs mit 2 Ig-Domänen die große Variabilität erzielen: Somit werden z.B. die 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie M11 nicht durch 98 unterschiedliche Ig1-Domänen und 98 unterschiedliche Ig2-Domänen kodiert. Allerdings ist auch das Gegenteil nicht der Fall, dass sich z.B. 1 konstante Ig1-Domäne mit 98 unterschiedlichen Ig2-Domänen paart, sondern 74 unterschiedliche Ig1-Domänen sorgen in Paarung mit 81 unterschiedlichen Ig2-

Domänen für die 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen.

Zusätzlich zeigte sich im Vergleich der Ig1- bzw. Ig2-Domänen von M11 mit diesen von R11, dass es neben den 3 – für den gesamten Rezeptor (Ig1+Ig2) - identischen Proteinsequenzen zwischen M11 und R11 weitere Übereinstimmungen (s. Abbildung 35 und Abbildung 36) zwischen den beiden Hühnerlinien M11 und R11 gibt: so kam eine Ig1-Domäne (die Ig1-Domäne von „M11 CHIR2-765.pro“ war identisch mit der von „R11 CHIR2-830.pro“/ „R11 CHIR2-988.pro“/ „R11 CHIR2-879.pro“) sowohl in M11 als auch in R11 vor, allerdings paarte sich diese mit jeweils unterschiedlichen Ig2-Domänen, so dass die Proteinsequenzen für den gesamten Rezeptor (Ig1+Ig2) nicht identisch waren. Ebenso verhielt es sich mit zwei Ig2-Domänen (die Ig2-Domäne von „M11 CHIR2-698.pro“ war identisch mit der von „R11 CHIR2-901.pro“ und die Ig2-Domäne von „M11 CHIR2-753.pro“ war identisch mit der von „R11 CHIR2-879.pro“): beide kamen sowohl in M11 als auch in R11 vor, allerdings paarten sich diese mit jeweils unterschiedlichen Ig1-Domänen, so dass die Proteinsequenzen für den gesamten Rezeptor (Ig1+Ig2) nicht identisch waren.

Auch bei den drei – für den gesamten Rezeptor (Ig1+Ig2) - identischen Proteinsequenzen zwischen M11 und R11 zeigte sich eine Besonderheit: die Ig1-Domäne von „M11 CHIR2-724.pro“, die natürlich mit der von „R11 CHIR2-838.pro“ identisch war - da diese beiden Rezeptoren ja auf Gesamtebene (Ig1+Ig2) identisch sind – war überdies mit der von „M11 CHIR2-694.pro“ bzw. “ R11 CHIR2-858.pro“ (diese beiden Sequenzen sind auf Gesamtebene ebenfalls identisch) identisch (s. Abbildung 35 „2. gemischte Gruppe zwischen M11 und R11“). Die Konservierung dieser Ig1-Domäne in 2 der 3 Rezeptoren, die zwischen den Hühnerlinien auf Gesamtebene identisch sind, ist ein bedeutender Hinweis für die Wichtigkeit dieser Ig-Domäne. Auch ihr Vorkommen in noch 4 weiteren Rezeptoren, die sich allerdings mit jeweils einer anderen Ig2-Domäne paaren (in „M11 CHIR2-819.pro“ „M11 CHIR2-791.pro“, „M11 CHIR2-782.pro“ und in „R11 CHIR2-872.pro“) unterstreicht diese Bedeutung. Somit bestehen die 3 zwischen den Hühnerlinien M11 und R11 identischen Sequenzen nur aus 2 unterschiedlichen Ig1-Domänen (s. auch Abbildung 22).

Auch die Anzahl von einigen – mehrfach vorkommenden – Ig-Domänen ist verblüffend. So kommt eine Ig1-Domäne in der Kombination mit 8 unterschiedlichen Ig2-Domänen vor (s. Abbildung 35 „4. Gruppe R11 (8 Identische)“). Dies lässt darauf

schließen, dass sich diese Ig1-Domäne „bewährt“ hat und in der Kombination mit mehreren unterschiedlichen Ig2-Domänen ihre Funktion ausüben kann.

Somit zeigte sich, dass die CHIRs zwischen M11 und R11 konservierter sind, als auf den ersten – die Gesamtebene des Rezeptors (Ig1+Ig2) betrachtenden Blick – vermutet, da es neben den 3 Rezeptoren, die in ihrer Ig1+Ig2-Kombination zwischen M11 und R11 identisch sind, noch weitere – einzelne - Ig-Domänen gibt, die sowohl in M11 als auch in R11 vorkommen und einige Ig-Domänen in mehreren – auf Gesamtebene – unterschiedlichen Rezeptoren eingesetzt werden.

## 6.2.2. Nukleotidebene

### 6.2.2.1. Unterschiedliche Nukleotidsequenzen für dieselbe Proteinsequenz

Die Identifikation von unterschiedlichen Nukleotidsequenzen für ein und dasselbe Proteinprodukt (s. 5.3.5. und 5.4.4.) lässt entweder auf posttranskriptionelle Modifikationen der mRNA (Editing) oder eine wirklich genetische Variation (2 verschiedene Gene oder 2 verschiedene Allele eines Gens) schließen. Hinsichtlich der genetischen Variation bestehen bei 2 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen für ein und dasselbe Protein - z.B. bei der Sequenz für „M11 CHIR2-676“ bzw. „M11 CHIR2-710“ (diese beiden kodieren für dasselbe Protein, ihre Nukleotidebene unterscheidet sich allerdings in 2 bp (s. 5.3.5.)) - die Möglichkeiten, dass diese beiden Nukleotidsequenzen die beiden Allele desselben Gens sind, bei welchem sich 1 Allel durch 2 Punktmutationen verändert hat oder, dass diese 2 unterschiedliche Gene darstellen. Die Möglichkeit der alleinigen allelen Variation besteht allerdings nicht, wenn es 3 mögliche Nukleotidsequenzen für dasselbe Proteinprodukt gibt, wie es z.B. der Fall ist für die Gruppe der 11 identischen Proteinsequenzen „M11 CHIR2-821.pro, M11 CHIR2-820.pro, M11 CHIR2-803.pro, M11 CHIR2-799.pro, M11 CHIR2-775.pro, M11 CHIR2-763.pro, M11 CHIR2-738.pro, M11 CHIR2-712.pro, M11 CHIR2-702.pro, M11 CHIR2-699.pro, M11 CHIR2-694.pro“. Hier kodieren 3 verschiedene Nukleotidsequenzen (die Nukleotidsequenz von „M11 CHIR2-821\_nucleotid“, von „M11 CHIR2-820\_nucleotid“ und die Nukleotidsequenz der Gruppe der 9 identischen Nukleotidsequenzen „M11 CHIR2-803\_nucleotid, M11 CHIR2-799\_nucleotid, M11 CHIR2-775\_nucleotid, M11 CHIR2-763\_nucleotid, M11 CHIR2-738\_nucleotid, M11 CHIR2-712\_nucleotid, M11 CHIR2-702\_nucleotid, M11 CHIR2-699\_nucleotid, M11 CHIR2-694\_nucleotid“ (s. Abbildung 17)) ein und



dasselbe Protein. Dies würde bedeuten, dass es zumindest 2 getrennte Gene in der DNA geben muss, die denselben Rezeptor kodieren. Die Möglichkeit der allelen Variation bei 3 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen würde nur bestehen, falls eine mRNA nach der Transkription einer Veränderung durch Editing unterworfen worden wäre. Für die endgültige Beantwortung der Frage der genetischen Ebene/der Herkunft der gefundenen mRNAs muss allerdings die Rezeptorsequenz in ihrer gesamten Länge - nicht nur wie in dieser Arbeit die der 2 extrazellulären Ig-Domänen - betrachtet werden und mit der genetischen Ebene verglichen werden. Somit ist für die endgültige Abgrenzung, ob diese Gesamtsequenzen Allele eines Gens, 2 unterschiedliche Gene oder durch posttranskriptionelle Veränderungen entstanden sind, auch noch die Sequenzierung des kompletten LRCs beim Huhn notwendig. Laun et al. konnten innerhalb des Teil der genomischen Sequenz des LRC des LSL-Huhns, der durch sie charakterisiert worden ist [13] keine allelische Beziehung ihrer BAC-Contigs feststellen. Auch der erste Entwurf der Genomsequenz des red jungle fowls [1] liefert keine Antwort auf die Frage, da keine Informationen über den LRC vorhanden sind.

Allerdings ist sowohl die Möglichkeit der unterschiedlichen Allele für Gene des LRC als auch die Möglichkeit der doppelten Gene im LRC in der Literatur beschrieben. So besteht bei KIR-Genen eine hohe allelische Variabilität [9, 43]. Viertböck et al. vermuteten nach ihren Untersuchungen [11] eine Vielzahl von Allelen für die CHIRs. Laun et al. postulierten, dass - neben den Duplikationen von größeren DNA-Bereichen - die Duplikation von einzelnen Genen zur Expansion des CHIR-Clusters beigetragen hat [13]. Auch für den evolutionären Ursprung von einigen LRC-Genen beim Menschen wird eine Genduplikation angenommen [20]. Da Duplikationen von einem Urogen mit nachfolgender evolutionärer Auseinanderentwicklung für eine Vielzahl von Multigenfamilien bekannt sind - unter anderem für die HLA-Klasse-I-Gene - konstatierten schon Wende et al. [20], dass Duplikationen ein gebräuchliches Merkmal in der Evolution sind, um funktionelle Vielfalt entstehen zu lassen. Wie Volz et al. [9] in ihrem Review anmerkten, ist die Verdoppelung eines Gens besonders von Vorteil, da die Evolution hinsichtlich der Spezifität des Duplikates „spielen“ kann, bis eine passende gefunden ist, aber dennoch den originalen – funktionierenden – Rezeptor während dieses Spiels weiter exprimiert.

Daher erscheinen sowohl eine hohe Anzahl an verschiedenen Genen als auch ein hoher Grad an alleler Variation plausible Gründe für die gefundenen Sequenzen zu

sein, die auf Proteinebene identisch sind, sich aber auf Nukleotidebene unterscheiden.

#### **6.2.2.2. Identische Nukleotidsequenzen**

Neben der Möglichkeit des mehrfachen Ablesens eines Gens oder des Ablesens von mehreren vorhandenen identischen Genen, müssen auch das Vorhandensein mehrerer verschiedener Gene und von Allelen als Erklärung der gefundenen identischen mRNAs in Betracht gezogen werden.

Der Grund für das in Betracht Ziehen des Vorhandenseins mehrerer verschiedener Gene und von Allelen für die gefundenen identischen mRNAs, besteht darin, dass diese Identität differenziert zu betrachten ist. In dieser Arbeit – wie oben erwähnt – ist nur der extrazelluläre Bereich von CHIRs mit 2 Ig-Domänen kloniert und betrachtet worden und daher bezieht sich die Bezeichnung „identisch“ nur auf diesen Teil der CHIRs. Zu einem vollständigen Rezeptor gehören allerdings noch weitere Teile (die beiden Exons für das SP, das Exon für die TM und einen Teil der zytoplasmatischen Domäne und die eventuellen Exons für den intrazytoplasmatischen Teil s. 2.2.5.). Aus diesem Grund könnten sich 2 auf Nukleotidebene der 2 extrazellulären Ig-Domänen identische CHIRs mit 2 Ig-Domänen in ihrem restlichen Teil des Rezeptors unterscheiden. Dass dies wirklich der Fall sein kann, zeigt der Vergleich der Nukleotidsequenzen von „LSL CHIR2-B9“ und „LSL CHIR2-B11“ nur im Bereich der 2 Ig-Domänen mit den Nukleotidsequenzen dieser 2 Rezeptoren unter Einbeziehung des transmembranen, zytoplasmatischen und intrazytoplasmatischen Bereichs (s. Abbildung 23, Abbildung 24 und 5.6.3.): obwohl die Nukleotidsequenzen dieser beiden Rezeptoren im Bereich der 2 extrazellulären Ig-Domänen identisch sind (Abbildung 23), zeigte die Untersuchung der Nukleotidebene dieser beiden Sequenzen unter Einbeziehung des transmembranen, zytoplasmatischen und intrazytoplasmatischen Bereichs, dass diese beiden CHIRs nicht – auf die Gesamtlänge der Rezeptoren betrachtet – identisch sind (5 unterschiedliche bp in ihrem zytoplasmatischen Bereich, s. Abbildung 24). Die Aussage, dass es sich bei diesen beiden Sequenzen um Nukleotidsequenzen von 2 unterschiedlichen Genen und nicht um Allele eines Gens handelt kann in diesem Fall nur getroffen werden, da diese Sequenzen aus dem von Laun et al. [13] sequenzierten DNA-Bereich abgeleitet sind und man daher die Gene in diesem kennt.

### **6.2.2.3. Unterschiedliche Nukleotidsequenzen für unterschiedliche Proteinsequenzen**

Die Gründe der hohen Anzahl an verschiedenen Genen und des hohen Grades an Allelismus sind nicht nur für die gefundenen unterschiedlichen mRNAs, die dasselbe Protein für die 2 extrazellulären Ig-Domänen kodieren (s. 6.2.2.1.) und die gefundenen identischen mRNAs (s. 6.2.2.2.), eine Erklärung, sondern müssen natürlich auch als Erklärung der gefundenen unterschiedlichen mRNAs, die unterschiedliche Proteinsequenzen hinsichtlich der 2 extrazellulären Ig-Domänen kodieren, in Betracht gezogen werden. Allerdings ist es auch hier wiederum möglich, dass posttranskriptionelle Veränderungen stattgefunden haben. Somit ist z.B. bei den 98 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen, die die 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen für die extrazellulären 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 kodieren kein Rückschluss möglich, ob es sich um 98 unterschiedliche Gene, 49 Gene à 2 Allele oder weniger als 49 Gene (posttranskriptionelle Modifikationen) handelt.

### **6.2.2.4. Schlußbetrachtung**

Auch wenn für die in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen der restliche Teil der Rezeptoren (SP, TM-Bereich und intrazytoplasmatischer Bereich) bekannt wäre, wäre eine Unterscheidung, ob es sich bei verschiedenen mRNAs um Transkripte unterschiedlicher Gene oder von Allelen von Genen handelt und ob es sich bei identischen mRNAs um Transkripte von mehreren identischen Genen oder um das mehrfach vorhandene Transkript eines Gens handelt, nicht möglich, da die Sequenz der LRC-DNA einschließlich der Lage und Anzahl der Gene der CHIRs bei den Hühnerlinien M11 und R11 nicht bekannt ist. Aufgrund der vermuteten großen Unterschiede zwischen einzelnen Hühnerlinien [13] werden diese DNA-Sequenzen aber zur Klärung dieser Frage nötig sein, da ein Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen mit den – aus den Genen des sequenzierten Teils des LRCs des LSL-Huhns – abgeleiteten LSL-Sequenzen nur 3 Übereinstimmungen brachte (s. 5.7.2.). Somit wäre – gesetzt den Fall, dass diese 3 Sequenzen mit ihren LSL-Identischen auch im Rest der Rezeptorsequenz identisch sind – nur eine Zuordnung von 3 mRNA-Sequenzen zu ihren genetischen Loci möglich. Auch dies zeigt die große Variabilität der CHIRs/des LRCs zwischen unterschiedlichen Hühnerlinien.

Die Identifizierung von 2 Rezeptoren, die dieselben 2 extrazellulären Ig-Domänen besitzen, sich aber in ihrer vollen Länge unterscheiden („LSL CHIR2-B9“ und „LSL CHIR2-B11“) ist ein besonders wichtiger Punkt, da – wie unter 6.1. erwähnt – der extrazelluläre Teil der allein für die Ligandenbindung verantwortliche ist. Somit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Vielzahl der in dieser Arbeit identifizierten identischen Ligandenbindungsstellen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen Bestandteil sowohl unterschiedlicher Rezeptortypen (hemmend, aktivierend, bifunktionell), als auch innerhalb dieser Rezeptortypen nochmals unterschiedlicher Rezeptoren sein könnten.

### **6.3. 23 CHIR-Konstrukte**

Ob die - aus den 166 verschiedenen Proteinsequenzen von M11 und R11 ausgewählten - 23 CHIRs mit 2 Ig-Domänen, die als CHIR-Konstrukte für die Ligandensuche verwendet werden sollen (s. 5.8.1. und Abbildung 25) die „richtigen“ Rezeptoren sein werden, um Liganden zu finden wird sich erst in der Ligandensuche selbst herausstellen.

Allerdings erscheinen die Auswahlkriterien „Vorkommen in mehr als einer Hühnerlinie“ bzw. „ $\geq 6$  identische Proteinsequenzen in einer Hühnerlinie“, die zu 10 Sequenzen geführt haben, sehr schlüssig und lassen auf einen Erfolg der Ligandensuche hoffen. Als Kritikpunkt könnte der Vergleich mit den Proteinsequenzen des Huhns der Linie LSL aufgeführt werden, da diese nur „vorhergesagt“ sind und nicht nachgewiesen ist, dass sie auch exprimiert werden. Dieser Vergleich lieferte 2 repräsentative Sequenzen („M11 CHIR2-780.pro“ und „M11 CHIR2-705.pro“ s. 5.7.1.), da diese beiden jeweils mit einer LSL-Sequenz identisch waren. Zum einen wäre eine dieser beiden Sequenzen („M11 CHIR2-780.pro“) aufgrund des Kriteriums „ $\geq 6$  identische Proteinsequenzen in einer Hühnerlinie“ sowieso ausgewählt worden, da sie 6 Mal in einem Huhn gefunden worden ist. Zum anderen ist das Vorhandensein eines potentiell funktionellen Genes ein guter Hinweis für eine eventuelle Expression.

Auch die große Anzahl (23 Stück) der verschiedenen Rezeptoren, mit Hilfe derer Liganden gesucht werden sollen, erhöht die Wahrscheinlichkeit des Erfolgs. Ob natürlich – bei der Auswahl der 13 Sequenzen anhand der Unterteilung des Baums anhand von größeren Ästen in Gruppen und der Auswahl anhand der Auflage, dass von jedem größeren Ast mindestens 1 Sequenz als repräsentative Sequenz

vorhanden sein soll - eventuell eine andere Sequenz der Gruppe nicht die bessere gewesen wäre, kann nicht beantwortet werden. Allerdings liegen die anderen 143 Sequenzen als Plasmide vor und somit besteht die Möglichkeit, die Ligandensuche jederzeit mit Hilfe einer neu ausgewählten Sequenz zu erweitern.

Zusätzlich spricht die Sequenzdiversität der 23 ausgewählten Rezeptoren mit Identitäten zwischen 59,3 % bis 99,5 % (s. Abbildung 26) und 2 unterschiedlichen Längen („M11 CHIR2-679.pro“ ist 194 Aminosäuren lang, die anderen 22 Sequenzen sind 195 Aminosäuren lang) für eine breit gefächerte Gruppe, anhand derer aber auch die Bindung von Liganden von 2 sehr ähnlichen Rezeptoren (99,5 % Identität/Unterschied in 1 Aminosäure zwischen der Proteinsequenz von „M11 CHIR2-682.pro“ und „M11 CHIR2-780.pro“) überprüft werden kann.

## 6.4. Ausblick

### 6.4.1. Ligandensuche

Die Fülle der in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen erlaubt eine Vielzahl von weiteren Untersuchungen. Die interessanteste ist mit Sicherheit die Ligandensuche. Als Kandidaten hierfür kommen neben Antikörpern bzw. Fc-Stücken von Antikörpern (s. 2.2.6.5.) natürlich auch MHC-I-Moleküle in Betracht. Die letzte Vermutung stützt sich vor allem auf einen Analogieschluss zu den Liganden der CHIR-ähnlichen Rezeptoren KIR und LILR [11, 13]. Allerdings liegt beim Huhn ein „minimaler essentieller MHC“ [44] vor, bei welchem eventuell nur 1 MHC-I-Molekül dominant exprimiert wird [45]. Dies könnte die Erklärung der Vielfalt der CHIRs anhand der Hypothese der Interaktion einer polymorphen Familie mit ebenfalls polymorphen Liganden [20] erschweren. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass die CHIRs eventuell nicht nur mit dem MHC-I-Molekül interagieren könnten, sondern auch mit dem in diesem gebundenen Peptid, wie es z.B. für KIR2DL2 gezeigt worden ist. Dieser interagiert nicht nur mit dem HLA-Molekül, sondern auch mit dem gebundenen Peptid [9]. Auch Hämagglutinin sollte als potentieller Ligand überprüft werden, da dieses als Ligand von Nkp46 identifiziert worden ist (s. 2.2.6.6.) Darüber hinaus sollten auch Kollagene als mögliche Liganden in Betracht gezogen und getestet werden, da diese sowohl als Liganden des GPVI (s. 2.2.6.7.) als auch der LAIR-Moleküle (s. 2.2.6.3.) identifiziert worden sind. Neben diesen „physiologischen“ Liganden könnten die CHIRs aber auch Andockungspunkte für Pathogene sein.

Gerade bei hemmenden Immunrezeptoren gibt es die unterschiedlichsten Beispiele dafür, dass Pathogene diese Rezeptoren benutzen, um einer Immunantwort zu entgehen. So produzieren diese z.B. selbst Liganden für diese hemmenden Rezeptoren, um durch eine Herunterregulierung der Immunantwort dieser zu entgehen [46]. Somit ist das Einbeziehen von z.B. virusinfizierten Zellen in die Ligandensuche mit Sicherheit ebenfalls ein guter Ansatzpunkt.

#### 6.4.2. Untersuchung der Ig1-Domänen bzw. Ig2-Domänen auf Nukleotidebene

Eine Untersuchung der Ig1-Domänen bzw. Ig2-Domänen auf Nukleotidebene wäre wertvoll, um eine Aussage über eventuelle Mechanismen der Entstehung der Vielfältigkeit der CHIRs treffen zu können. Zwar lassen die Untersuchungen auf Proteinebene schon vermuten, dass der Mechanismus des „domain-shufflings“, d.h. des Verschiebens von kompletten Exons, die einzelne extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen kodieren, auch – neben der Entstehung der Vielzahl der KIRs [43] - bei der Entstehung der Vielzahl der CHIRs eine Rolle gespielt hat, allerdings kann dies letztendlich erst postuliert werden, wenn die Nukleotidebene der – auf Proteinebene - identischen Ig1- bzw. Ig2-Domänen untersucht ist. Erwähnenswert ist an dieser Stelle auch, dass Rajalingam et al. [43] bei ihren Untersuchungen über die Entstehung der KIRs herausfanden, dass nicht nur Exons, die extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen kodieren, neu gruppiert werden, sondern auch die Exons, die die Stamm-, TM- und zytoplasmatische Region kodieren. Allerdings folgerten Laun et al. aus ihren Ergebnissen [13], dass das „exon-shuffling“ wahrscheinlich ein seltenes Ereignis innerhalb der CHIR-Entwicklung gewesen ist. Es bleibt abzuwarten, welche der beiden Ansichten sich als richtig erweisen wird.

#### 6.4.3. Untersuchung eines zweiten Huhns derselben Linie

Ein Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen Daten mit Daten aus einem 2. Huhn derselben Linie (d.h. ein 2. M11-Huhn oder ein 2. R11-Huhn) wäre sehr interessant, da anhand des Vergleichs der in diesem vorkommenden Rezeptoren mit den in dieser Arbeit gefundenen eine Aussage über die Variabilität der Multigenfamilie innerhalb derselben Hühnerlinie getroffen werden könnte.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine weitläufige Untersuchung der CHIRs mit 2 Ig-Domänen (CHIR-2D) bei 2 Hühnern unterschiedlicher Linien (M11 und R11) durchgeführt. Hierfür wurden Primer entworfen, mit deren Hilfe möglichst viele verschiedene Ligandenbindungsstellen/extrazelluläre Domänen – bestehend aus einer membrandistalen Ig1- und einer membranproximalen Ig2-Domäne - der CHIR-2D aus dem Genom kloniert werden konnten. Insgesamt wurden aus cDNA von PBMCs 142 Proteinsequenzen von extrazellulären Domänen der CHIR-2D beim Huhn der Linie M11 identifiziert und 117 beim Huhn der Linie R11. Die weiteren Untersuchungen dieser erbrachten 98 unterschiedliche Proteinsequenzen beim Huhn der Linie M11 und 71 unterschiedliche beim Huhn der Linie R11. Ein Vergleich dieser Sequenzen zwischen den beiden Hühnerlinien ergab 3 Sequenzen, die sowohl in M11 als auch in R11 vorkamen. Somit zeigte sich eine enorme Menge von exprimierten CHIR-2D und ein hoher Grad an Polymorphismus dieser innerhalb und zwischen beiden Hühnerlinien.

Die Untersuchung der identischen Sequenzen innerhalb einer Hühnerlinie (58 Stück in 14 Gruppen beim Huhn der Linie M11 und 63 Stück in 17 Gruppen beim Huhn der Linie R11) erbrachte die Erkenntnis, dass einige Sequenzen sehr häufig ( $\geq 6$  Mal) vorhanden waren.

Die Untersuchung der Nukleotidebene der gefundenen Sequenzen brachte 103 unterschiedliche M11-Nukleotidsequenzen und 77 unterschiedliche R11-Nukleotidsequenzen zum Vorschein. Diese Differenz von 5 (M11) bzw. 6 Sequenzen (R11) im Vergleich zur Proteinebene zeigte, dass eine Proteinsequenz – aufgrund des degenerierten genetischen Codes - durch mehrere unterschiedliche Nukleotidsequenzen generiert werden kann.

Zur weiteren Aufklärung der Ursachen des großen Polymorphismus der CHIR-2D wurden die Ig1-Domänen und die Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen M11-Proteinsequenzen bzw. der 71 unterschiedlichen R11-Proteinsequenzen getrennt voneinander untersucht. Hierbei kam heraus, dass die 98 M11-Ig1-Domänen aus 74 unterschiedlichen, die 71 R11-Ig1-Domänen aus 48 unterschiedlichen, die 98 M11-Ig2-Domänen aus 81 unterschiedlichen und die 71 R11-Ig2-Domänen aus 51 unterschiedlichen bestanden. Zudem ergab der Vergleich der Ig1- bzw. Ig2-Domänen zwischen den beiden Hühnerlinien, dass – neben den drei Ig1-Domänen bzw. den drei Ig2-Domänen, die sowohl in M11 als auch in R11 vorkamen, da diese

drei Rezeptoren auf Ig1+Ig2-Ebene zwischen beiden Hühnerlinien identisch waren (s. oben) - weitere Ig-Domänen sowohl in M11 als auch in R11 vorkamen: 1 weitere Ig1-Domäne und 2 weitere Ig2-Domänen. Durch diese Untersuchung zeigte sich, dass die CHIRs zwischen M11 und R11 konservierter sind, als auf den ersten - die Gesamtebene der Rezeptoren (Ig1+Ig2) betrachtenden Blick - vermutet.

Als letzte Untersuchung wurde ein Vergleich der 98 bzw. 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen der Gesamtebene (Ig1+Ig2) von M11 und R11 mit den vorhergesagten Proteinsequenzen des Huhns der Linie LSL durchgeführt. Es zeigte sich, dass 1 Rezeptor, der auch schon zwischen M11 und R11 identisch war, ebenso im Huhn der Linie LSL vorkam. Zudem gab es 2 weitere Rezeptoren, die zwischen M11 und LSL identisch waren.

All diese Untersuchungsergebnisse wurden hierauf für die Auswahl von repräsentativen Rezeptoren, mit Hilfe derer Liganden gesucht werden sollten, verwendet. Unter Einbeziehung eines phylogenetischen Baums ergaben sich 23 verschiedene Sequenzen, die der Ligandensuche dienen sollten.

Im zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit konnten insgesamt 6 der 23 stabilen Zelllinien für die Ligandensuche generiert werden.

Somit ergibt sich aus dieser Arbeit eine große Möglichkeit für weitere Untersuchungen bezüglich dieser hochvariablen Rezeptorfamilie, von welchen die Ligandensuche mit Sicherheit die wichtigste sein wird.



## 8. Summary

### Title: “Polymorphism of the chicken Ig-like receptors (CHIRs)”

In this thesis an extensive analysis of the CHIRs with 2 Ig-domains (CHIR-2D) was conducted in 2 chickens of different strains (M11 and R11). For this purpose primers were designed via these as many different areas for ligand binding/extracellular domains as possible – consisting of one membrane-distal Ig1-domain and one membrane-proximal Ig2-domain - could be extracted from the genome. Altogether out of the cDNA of PBMCs 142 protein sequences of extracellular domains of CHIR-2D were identified in the M11-chicken and 117 in the R11-chicken. Further studies of these sequences revealed 98 different protein sequences in the M11-chicken and 71 different in the R11-chicken. A comparison of these sequences between the two chicken strains showed 3 sequences that were found both in M11 and R11. Hence an enormous quantity of expressed CHIR-2D and a high degree of polymorphism of these appeared within and between the two chicken strains.

The analysis of the identical sequences within one chicken strain (58 in 14 groups in the M11-chicken and 63 in 17 groups in the R11-chicken) yielded the result that a couple of sequences appeared very often ( $\geq 6$  times).

The analysis of the nucleotide level of the identified sequences revealed 103 different M11-nucleotide-sequences and 77 different R11-nucleotide-sequences. This difference of 5 (M11) respectively 6 sequences (R11) in comparison with the protein level demonstrated that one protein sequence could be generated by several different nucleotide sequences – due to the degenerated genetic code.

For the further elucidation of the causes for the huge polymorphism of the CHIR-2D the Ig1-domains and the Ig2-domains of the 98 different M11-protein-sequences respectively of the 71 different R11-protein-sequences were analyzed separated from each other. It appeared that the 98 M11-Ig1-domains were composed of 74 different Ig1-domains, that the 71 R11-Ig1-domains were composed of 48 different Ig1-domains, that the 98 M11-Ig2-domains were composed of 81 different Ig2-domains and the 71 R11-Ig2-domains were composed of 51 different Ig2-domains. Moreover the comparison of the Ig1- respectively Ig2-domains between the 2 chicken strains yielded the result that – beside the three Ig1-domains respectively three Ig2-domains that appeared both in M11 and in R11 because of the identity of these three receptors regarding the Ig1+Ig2-level in both chicken strains (vide supra) – more Ig-

domains appeared in both, M11 and R11: 1 more Ig1-domain and 2 more Ig2-domains. This analysis revealed that the CHIRs were more conserved between M11 and R11 than it was suspected after the first look at the full-length-level (Ig1+Ig2) of the receptors.

The last analysis was a comparison of the 98 respectively 71 different protein sequences of the full-length-level of M11 and R11 with the predicted protein sequences of the chicken of the LSL-strain. It became apparent that 1 receptor that was identical between M11 and R11 also existed in the LSL-chicken. Moreover there were 2 additional receptors that were identical between M11 and LSL.

All these findings were then used for the selection of representative receptors via these ligands should be searched. With the inclusion of a phylogenetic tree 23 different sequences arose as a result that should serve the searching for ligands.

In the timeframe of this thesis 6 of the 23 stable cell-lines for the detecting of ligands could be generated.

Therefore a great potential for further investigations concerning this highly variable receptor family results from this work and the searching for ligands will be the most important investigation for sure.

## 9. Literaturverzeichnis

1. Consortium, I.C.G.S., *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
2. 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*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13245-50.
3. Wiesner, E., Ribbeck, R., *Lexikon der Veterinärmedizin*. Enke, 2000.
4. Janeway, C., Travers, P., Walport M., Shlomchik, M., *Immunologie 5.Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002
5. Delves, P., Martin, S., Burton, D., Roitt, I., *Roitt's essential immunology*. Blackwell Publishing Ltd., 2006.
6. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 381-405.
7. Martin, A.M., et al., *Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men*. Trends Immunol, 2002. **23**(2): p. 81-8.
8. Nikolaidis, N., J. Klein, and M. Nei, *Origin and evolution of the Ig-like domains present in mammalian leukocyte receptors: insights from chicken, frog, and fish homologues*. Immunogenetics, 2005. **57**(1-2): p. 151-7.
9. Volz, A., et al., *Genesis of the ILT/LIR/MIR clusters within the human leukocyte receptor complex*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 39-51.
10. Nikolaidis, N., et al., *Origin and evolution of the chicken leukocyte receptor complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4057-62.
11. 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.
12. Wilson, M.J., et al., *Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4778-83.
13. 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**(5): p. e73.
14. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(28): p. 11718-23.
15. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
16. 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*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7385-93.
17. Tomasello, E., et al., *Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells*. Semin Immunol, 2000. **12**(2): p. 139-47.
18. Viertlboeck, B.C., *Molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung neuer "Chicken Ig-like" Rezeptoren*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde, 2004.
19. Chemnitz, J.M., et al., *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 945-54.

20. Wende, H., A. Volz, and A. Ziegler, *Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster*. Immunogenetics, 2000. **51**(8-9): p. 703-13.
21. Wende, H., et al., *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4*. Mamm Genome, 1999. **10**(2): p. 154-60.
22. Kelley, J., L. Walter, and J. Trowsdale, *Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters*. PLoS Genet, 2005. **1**(2): p. 129-39.
23. Laun, K., *Kartierung, Expressionsanalyse und Evolution von Immunrezeptor (CHIR) - Genen beim Huhn (Gallus gallus domesticus)*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, 2006.
24. Torkar, M., et al., *Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex*. Eur J Immunol, 1998. **28**(12): p. 3959-67.
25. Storset, A.K., et al., *Natural killer cell receptors in cattle: a bovine killer cell immunoglobulin-like receptor multigene family contains members with divergent signaling motifs*. Eur J Immunol, 2003. **33**(4): p. 980-90.
26. Cosman, D., et al., *A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules*. Immunity, 1997. **7**(2): p. 273-82.
27. Samaridis, J. and M. Colonna, *Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways*. Eur J Immunol, 1997. **27**(3): p. 660-5.
28. Wagtmann, N., et al., *A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors*. Curr Biol, 1997. **7**(8): p. 615-8.
29. Lebbink, R.J., et al., *Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1419-25.
30. 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. 5535-43.
31. Arnon, T.I., et al., *The Crystal Structure of CHIR-AB1: A Primordial Avian Classical Fc Receptor*. J Mol Biol, 2008.
32. Ponassi, M., et al., *Structure of the human NK cell triggering receptor NKp46 ectodomain*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(2): p. 317-23.
33. Biassoni, R., et al., *The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity*. Eur J Immunol, 1999. **29**(3): p. 1014-20.
34. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 1055-60.
35. Falco, M., et al., *Identification of the rat homologue of the human NKp46 triggering receptor*. Immunol Lett, 1999. **68**(2-3): p. 411-4.
36. Storset, A.K., et al., *NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 669-76.
37. Clemetson, J.M., et al., *The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29019-24.

38. Nieswandt, B., et al., *Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23998-4002.
39. de Wit, T.P., et al., *Structure of the gene for the human myeloid IgA Fc receptor (CD89)*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1203-9.
40. Wines, B.D., et al., *Identification of residues in the first domain of human Fc alpha receptor essential for interaction with IgA*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 2146-53.
41. Sanderson, S. and N. Shastri, *LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids*. Int Immunol, 1994. **6**(3): p. 369-76.
42. DuBridge, R.B., et al., *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(1): p. 379-87.
43. Rajalingam, R., P. Parham, and L. Abi-Rached, *Domain shuffling has been the main mechanism forming new hominoid killer cell Ig-like receptors*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 356-69.
44. Kaufman, J., et al., *The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex*. Nature, 1999. **401**(6756): p. 923-5.
45. Kaufman, J., et al., *Gene organisation determines evolution of function in the chicken MHC*. Immunol Rev, 1999. **167**: p. 101-17.
46. Lebbink, R.J. and L. Meyaard, *Non-MHC ligands for inhibitory immune receptors: novel insights and implications for immune regulation*. Mol Immunol, 2007. **44**(9): p. 2153-64.

## Anhang I: Exceltabellen

|    | A                        | B           | C      | D                            |
|----|--------------------------|-------------|--------|------------------------------|
| 1  | Name                     | Sequenz     |        |                              |
| 2  | M11 CHIR2-711.pro        | LLHPIQRVSLC | FALSCH |                              |
| 3  | M11 CHIR2-761.pro        | LLHPIQRVSLC | FALSCH |                              |
| 4  | M11 CHIR2-768.pro        | LLHPIQRVSLC | FALSCH |                              |
| 5  | M11 CHIR2-754.pro        | LLHPIQRVSLC | FALSCH |                              |
| 6  | M11 CHIR2-680.pro        | LLHPSQGVPL  | FALSCH |                              |
| 7  | M11 CHIR2-769.pro        | SLHPIQRVSLC | FALSCH |                              |
| 8  | M11 CHIR2-825.pro        | SLHPIQRVSLC | FALSCH | 1. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 9  | <b>M11 CHIR2-688.pro</b> | SLHPIQRVSLC | WAHR   |                              |
| 10 | M11 CHIR2-815.pro        | SLHPIQRVSLC | FALSCH |                              |
| 11 | M11 CHIR2-718.pro        | SLHPIQRVSLC | FALSCH |                              |
| 12 | <b>M11 CHIR2-683.pro</b> | SLHPSHGVSL  | FALSCH | 2. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 13 | M11 CHIR2-686.pro        | SLHPSHGVSL  | WAHR   |                              |
| 14 | M11 CHIR2-784.pro        | SLHPSHGVSL  | FALSCH |                              |
| 15 | M11 CHIR2-692.pro        | SLHPSHGVSL  | FALSCH |                              |
| 16 | M11 CHIR2-731.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 17 | M11 CHIR2-693.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 18 | M11 CHIR2-681.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 19 | M11 CHIR2-808.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 20 | M11 CHIR2-793.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 21 | M11 CHIR2-726.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 22 | M11 CHIR2-723.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 23 | M11 CHIR2-675.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH | 3. Gruppe<br>(6 Identische)  |
| 24 | M11 CHIR2-790.pro        | SLHPSQEVSL  | WAHR   |                              |
| 25 | <b>M11 CHIR2-780.pro</b> | SLHPSQEVSL  | WAHR   |                              |
| 26 | M11 CHIR2-722.pro        | SLHPSQEVSL  | WAHR   |                              |
| 27 | M11 CHIR2-696.pro        | SLHPSQEVSL  | WAHR   |                              |
| 28 | M11 CHIR2-690.pro        | SLHPSQEVSL  | WAHR   |                              |
| 29 | <b>M11 CHIR2-676.pro</b> | SLHPSQEVSL  | FALSCH | 4. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 30 | M11 CHIR2-710.pro        | SLHPSQEVSL  | WAHR   |                              |
| 31 | M11 CHIR2-682.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 32 | M11 CHIR2-823.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 33 | M11 CHIR2-810.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 34 | M11 CHIR2-779.pro        | SLHPSQEVSL  | FALSCH |                              |
| 35 | M11 CHIR2-759.pro        | SLHPSQGMS   | FALSCH | 5. Gruppe<br>(4 Identische)  |
| 36 | M11 CHIR2-757.pro        | SLHPSQGMS   | WAHR   |                              |
| 37 | M11 CHIR2-749.pro        | SLHPSQGMS   | WAHR   |                              |
| 38 | <b>M11 CHIR2-733.pro</b> | SLHPSQGMS   | WAHR   |                              |
| 39 | M11 CHIR2-767.pro        | SLHPSQGMS   | FALSCH |                              |
| 40 | M11 CHIR2-734.pro        | SLHPSQGVPL  | FALSCH |                              |
| 41 | M11 CHIR2-770.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH |                              |
| 42 | M11 CHIR2-809.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH |                              |
| 43 | M11 CHIR2-789.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH |                              |
| 44 | M11 CHIR2-802.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH |                              |
| 45 | M11 CHIR2-788.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH | 6. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 46 | <b>M11 CHIR2-787.pro</b> | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 47 | M11 CHIR2-800.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH | 7. Gruppe<br>(11 Identische) |
| 48 | M11 CHIR2-778.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 49 | M11 CHIR2-777.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 50 | M11 CHIR2-766.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 51 | M11 CHIR2-756.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 52 | M11 CHIR2-752.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 53 | M11 CHIR2-742.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 54 | M11 CHIR2-737.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 55 | M11 CHIR2-715.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 56 | M11 CHIR2-709.pro        | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 57 | <b>M11 CHIR2-697.pro</b> | SLHPSQGVSL  | WAHR   |                              |
| 58 | M11 CHIR2-720.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH |                              |
| 59 | M11 CHIR2-755.pro        | SLHPSQGVSL  | FALSCH |                              |

|     | A                        | B          | C      | D                              |
|-----|--------------------------|------------|--------|--------------------------------|
|     | Name                     | Sequenz    |        |                                |
| 60  | M11 CHIR2-708.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 61  | M11 CHIR2-783.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 62  | M11 CHIR2-740.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 63  | M11 CHIR2-741.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 64  | M11 CHIR2-753.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 65  | M11 CHIR2-691.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 66  | M11 CHIR2-816.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 67  | M11 CHIR2-730.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 68  | M11 CHIR2-824.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 69  | M11 CHIR2-739.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 70  | M11 CHIR2-771.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 71  | M11 CHIR2-717.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH | } 8. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 72  | <b>M11 CHIR2-698.pro</b> | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 73  | M11 CHIR2-716.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 74  | M11 CHIR2-804.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 75  | M11 CHIR2-805.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 76  | M11 CHIR2-735.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 77  | M11 CHIR2-758.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 78  | <b>M11 CHIR2-679.pro</b> | SLHPSQGVSI | FALSCH | } 9. Gruppe<br>(6 Identische)  |
| 79  | M11 CHIR2-677.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 80  | M11 CHIR2-727.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 81  | M11 CHIR2-713.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 82  | M11 CHIR2-701.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 83  | M11 CHIR2-695.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 84  | M11 CHIR2-792.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 85  | M11 CHIR2-814.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 86  | M11 CHIR2-794.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 87  | M11 CHIR2-719.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 88  | M11 CHIR2-812.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 89  | M11 CHIR2-729.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 90  | M11 CHIR2-685.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 91  | M11 CHIR2-762.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH | } 10. Gruppe<br>(3 Identische) |
| 92  | M11 CHIR2-745.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 93  | <b>M11 CHIR2-721.pro</b> | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 94  | M11 CHIR2-760.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 95  | M11 CHIR2-703.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 96  | M11 CHIR2-773.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 97  | M11 CHIR2-807.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 98  | M11 CHIR2-700.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 99  | M11 CHIR2-786.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 100 | M11 CHIR2-736.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 101 | M11 CHIR2-704.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 102 | M11 CHIR2-689.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 103 | M11 CHIR2-728.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 104 | M11 CHIR2-785.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 105 | M11 CHIR2-774.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH | } 11. Gruppe<br>(2 Identische) |
| 106 | <b>M11 CHIR2-687.pro</b> | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 107 | M11 CHIR2-772.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 108 | M11 CHIR2-678.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 109 | M11 CHIR2-751.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 110 | M11 CHIR2-732.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 111 | M11 CHIR2-764.pro        | SLHPSQGVSI | FALSCH |                                |
| 112 | <b>M11 CHIR2-791.pro</b> | SLHPSQGVSI | FALSCH | } 12. Gruppe<br>(3 Identische) |
| 113 | M11 CHIR2-747.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |
| 114 | M11 CHIR2-714.pro        | SLHPSQGVSI | WAHR   |                                |

|     | A                        | B          | C      | D                             |
|-----|--------------------------|------------|--------|-------------------------------|
|     | Name                     | Sequenz    |        |                               |
| 115 | M11 CHIR2-821.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH | 13. Gruppe<br>(11 Identische) |
| 116 | M11 CHIR2-820.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 117 | M11 CHIR2-803.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 118 | M11 CHIR2-799.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 119 | M11 CHIR2-775.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 120 | M11 CHIR2-763.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 121 | M11 CHIR2-738.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 122 | M11 CHIR2-712.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 123 | M11 CHIR2-702.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 124 | M11 CHIR2-699.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 125 | <b>M11 CHIR2-694.pro</b> | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 126 | M11 CHIR2-819.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 127 | M11 CHIR2-782.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 128 | M11 CHIR2-724.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 129 | M11 CHIR2-707.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 130 | M11 CHIR2-813.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 131 | M11 CHIR2-806.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 132 | M11 CHIR2-795.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 133 | M11 CHIR2-801.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 134 | M11 CHIR2-822.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 135 | M11 CHIR2-743.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 136 | M11 CHIR2-811.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 137 | M11 CHIR2-706.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH | 14. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 138 | <b>M11 CHIR2-705.pro</b> | SLHPSQGVSL | WAHR   |                               |
| 139 | M11 CHIR2-725.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 140 | M11 CHIR2-827.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 141 | M11 CHIR2-765.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 142 | M11 CHIR2-796.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                               |
| 143 | M11 CHIR2-781.pro        | SLYPSQGVSL | FALSCH |                               |

**Abbildung 29: Exceltabelle zur Darstellung der 142 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11**

In Spalte A sind die Namen der 142 Proteinsequenzen, in Spalte B die zu Spalte A gehörige Sequenz, in Spalte C das Ergebnis des Vergleichs zwei aufeinander folgender Sequenzen und in Spalte D die Gruppen der Identischen mit der Anzahl der Identischen pro Gruppe wiedergegeben. Die Sequenzen in Spalte B sind aus Platzgründen nur in ihrem Anfangsbereich dargestellt. Spalte C Zeile n zeigt das Ergebnis der Formel „=identisch (B(n-1);Bn)“. Aufgrund der vorangegangenen Sortierung nach Spalte B sind die Sequenzen in Spalte B entsprechend ihrer Ähnlichkeit aufgereiht. Die Sequenzen, die fett markiert sind, stellen den Repräsentanten einer Gruppe von Identischen dar (s. 5.3.3.).



|    | A               | B         | C      | D                             |
|----|-----------------|-----------|--------|-------------------------------|
| 1  | Name            | Sequenz   |        |                               |
| 2  | >S686_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 1.Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 3  | >S683_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 4  | >S784_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 5  | >S692_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 6  | >S675_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 7  | >S808_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 8  | >S793_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 9  | >S726_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 10 | >S723_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 11 | >S676_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 12 | >S790_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 2.Gruppe<br>(5 Identische)  |
| 13 | >S780_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 14 | >S722_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 15 | >S696_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 16 | >S690_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 17 | >S682_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 18 | >S810_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 19 | >S779_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 20 | >S681_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 21 | >S710_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 22 | >S693_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 23 | >S759_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 3.Gruppe<br>(4 Identische)  |
| 24 | >S757_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 25 | >S749_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 26 | >S733_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 27 | >S767_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 28 | >S804_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 29 | >S716_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 30 | >S824_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 31 | >S771_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 32 | >S717_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 4.Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 33 | >S698_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 34 | >S758_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 35 | >S734_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 36 | >S827_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 37 | >S725_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 38 | >S765_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 39 | >S811_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 40 | >S706_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 5.Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 41 | >S705_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 42 | >S730_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 43 | >S809_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 44 | >S816_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 45 | >S753_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 46 | >S783_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 47 | >S741_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 48 | >S708_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 49 | >S788_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 6.Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 50 | >S787_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 51 | >S755_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 52 | >S800_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 7.Gruppe<br>(11 Identische) |
| 53 | >S778_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 54 | >S777_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 55 | >S766_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 56 | >S756_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 57 | >S752_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 58 | >S742_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 59 | >S737_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 60 | >S715_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 61 | >S709_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 62 | >S697_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                               |
| 63 | >S720_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 64 | >S802_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 65 | >S789_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 66 | >S691_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 67 | >S770_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 68 | >S801_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 69 | >S822_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 70 | >S805_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 71 | >S729_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |
| 72 | >S735_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                               |

|     | A               | B         | C      | D                              |
|-----|-----------------|-----------|--------|--------------------------------|
|     | Name            | Sequenz   |        |                                |
| 73  | >S703_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 74  | >S760_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 75  | >S814_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 76  | >S727_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 8. Gruppe<br>(6 Identische)  |
| 77  | >S713_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 78  | >S701_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 79  | >S695_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 80  | >S679_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 81  | >S677_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 82  | >S792_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 83  | >S794_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 84  | >S812_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 85  | >S685_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 86  | >S762_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 9. Gruppe<br>(3 Identische)  |
| 87  | >S745_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 88  | >S721_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 89  | >S739_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 90  | >S724_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 91  | >S821_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 92  | >S751_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 93  | >S704_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 94  | >S774_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | } 10. Gruppe<br>(2 Identische) |
| 95  | >S687_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                                |
| 96  | >S678_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 97  | >S785_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 98  | >S728_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 99  | >S689_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 100 | >S773_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 101 | >S807_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 102 | >S700_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 103 | >S786_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 104 | >S736_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 105 | >S743_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 106 | >S772_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 107 | >S719_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 108 | >S769_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                                |
| 109 | >S781_nucleotid | TCACTGTAC | FALSCH |                                |
| 110 | >S823_nucleotid | TCATTGCAC | FALSCH |                                |
| 111 | >S796_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 112 | >S731_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 113 | >S740_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 114 | >S707_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 115 | >S819_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 116 | >S803_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH | } 11. Gruppe<br>(9 Identische) |
| 117 | >S799_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 118 | >S775_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 119 | >S763_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 120 | >S738_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 121 | >S712_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 122 | >S702_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 123 | >S699_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 124 | >S694_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 125 | >S791_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH | } 12. Gruppe<br>(2 Identische) |
| 126 | >S714_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 127 | >S747_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 128 | >S782_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 129 | >S820_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 130 | >S764_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 131 | >S813_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 132 | >S806_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 133 | >S732_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 134 | >S795_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 135 | >S815_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 136 | >S688_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH | } 13. Gruppe<br>(2 Identische) |
| 137 | >S825_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                                |
| 138 | >S718_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 139 | >S680_nucleotid | TTGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 140 | >S754_nucleotid | TTGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 141 | >S768_nucleotid | TTGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 142 | >S761_nucleotid | TTGCTGCAC | FALSCH |                                |
| 143 | >S711_nucleotid | TTGCTGCAC | FALSCH |                                |

**Abbildung 30: Exceltabelle der 142 Nukleotidsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus dem Huhn der Linie M11**

In Spalte A sind die Namen der 142 Nukleotidsequenzen, in Spalte B die zu Spalte A gehörige Sequenz, in Spalte C das Ergebnis des Vergleichs zwei aufeinander folgender Sequenzen und in Spalte D die Gruppen der Identischen mit der Anzahl der Identischen pro Gruppe wiedergegeben. Die Sequenzen in Spalte B sind aus Platzgründen nur in ihrem Anfangsbereich dargestellt. Spalte C-Zeile n zeigt das Ergebnis der Formel „=identisch (B(n-1); Bn)“. Aufgrund der vorangegangenen Sortierung nach Spalte B sind die Sequenzen in Spalte B entsprechend ihrer Ähnlichkeit aufgereiht.

|                         |                   |                          |                 |
|-------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------|
| M11 CHIR2-686_nucleotid | } 2 Identische    | M11 CHIR2-686.pro        | } 2 Identische  |
| M11 CHIR2-683_nucleotid |                   | M11 CHIR2-683.pro        |                 |
| M11 CHIR2-790_nucleotid | } 5 Identische    | M11 CHIR2-790.pro        | } 6 Identische  |
| M11 CHIR2-780_nucleotid |                   | M11 CHIR2-780.pro        |                 |
| M11 CHIR2-722_nucleotid |                   | M11 CHIR2-722.pro        |                 |
| M11 CHIR2-696_nucleotid |                   | M11 CHIR2-696.pro        |                 |
| M11 CHIR2-690_nucleotid |                   | M11 CHIR2-690.pro        |                 |
|                         |                   | <b>M11 CHIR2-675.pro</b> |                 |
| M11 CHIR2-759_nucleotid | } 4 Identische    | M11 CHIR2-759.pro        | } 4 Identische  |
| M11 CHIR2-757_nucleotid |                   | M11 CHIR2-757.pro        |                 |
| M11 CHIR2-749_nucleotid |                   | M11 CHIR2-749.pro        |                 |
| M11 CHIR2-733_nucleotid |                   | M11 CHIR2-733.pro        |                 |
| M11 CHIR2-717_nucleotid | } 2 Identische    | M11 CHIR2-717.pro        | } 2 Identische  |
| M11 CHIR2-698_nucleotid |                   | M11 CHIR2-698.pro        |                 |
| M11 CHIR2-706_nucleotid | } 2 Identische    | M11 CHIR2-706.pro        | } 2 Identische  |
| M11 CHIR2-705_nucleotid |                   | M11 CHIR2-705.pro        |                 |
| M11 CHIR2-788_nucleotid | } 2 Identische    | M11 CHIR2-788.pro        | } 2 Identische  |
| M11 CHIR2-787_nucleotid |                   | M11 CHIR2-787.pro        |                 |
| M11 CHIR2-800_nucleotid | } 11 Identische   | M11 CHIR2-800.pro        | } 11 Identische |
| M11 CHIR2-778_nucleotid |                   | M11 CHIR2-778.pro        |                 |
| M11 CHIR2-777_nucleotid |                   | M11 CHIR2-777.pro        |                 |
| M11 CHIR2-766_nucleotid |                   | M11 CHIR2-766.pro        |                 |
| M11 CHIR2-756_nucleotid |                   | M11 CHIR2-756.pro        |                 |
| M11 CHIR2-752_nucleotid |                   | M11 CHIR2-752.pro        |                 |
| M11 CHIR2-742_nucleotid |                   | M11 CHIR2-742.pro        |                 |
| M11 CHIR2-737_nucleotid |                   | M11 CHIR2-737.pro        |                 |
| M11 CHIR2-715_nucleotid |                   | M11 CHIR2-715.pro        |                 |
| M11 CHIR2-709_nucleotid |                   | M11 CHIR2-709.pro        |                 |
| M11 CHIR2-697_nucleotid | M11 CHIR2-697.pro |                          |                 |
| M11 CHIR2-727_nucleotid | } 6 Identische    | M11 CHIR2-727.pro        | } 6 Identische  |
| M11 CHIR2-713_nucleotid |                   | M11 CHIR2-713.pro        |                 |
| M11 CHIR2-701_nucleotid |                   | M11 CHIR2-701.pro        |                 |
| M11 CHIR2-695_nucleotid |                   | M11 CHIR2-695.pro        |                 |
| M11 CHIR2-679_nucleotid |                   | M11 CHIR2-679.pro        |                 |
| M11 CHIR2-677_nucleotid |                   | M11 CHIR2-677.pro        |                 |
| M11 CHIR2-762_nucleotid | } 3 Identische    | M11 CHIR2-762.pro        | } 3 Identische  |
| M11 CHIR2-745_nucleotid |                   | M11 CHIR2-745.pro        |                 |
| M11 CHIR2-721_nucleotid |                   | M11 CHIR2-721.pro        |                 |
| M11 CHIR2-774_nucleotid | } 2 Identische    | M11 CHIR2-774.pro        | } 2 Identische  |
| M11 CHIR2-687_nucleotid |                   | M11 CHIR2-687.pro        |                 |
| M11 CHIR2-803_nucleotid | } 9 Identische    | M11 CHIR2-803.pro        | } 11 Identische |
| M11 CHIR2-799_nucleotid |                   | M11 CHIR2-799.pro        |                 |
| M11 CHIR2-775_nucleotid |                   | M11 CHIR2-775.pro        |                 |
| M11 CHIR2-763_nucleotid |                   | M11 CHIR2-763.pro        |                 |
| M11 CHIR2-738_nucleotid |                   | M11 CHIR2-738.pro        |                 |
| M11 CHIR2-712_nucleotid |                   | M11 CHIR2-712.pro        |                 |
| M11 CHIR2-702_nucleotid |                   | M11 CHIR2-702.pro        |                 |
| M11 CHIR2-699_nucleotid |                   | M11 CHIR2-699.pro        |                 |
| M11 CHIR2-694_nucleotid |                   | M11 CHIR2-694.pro        |                 |
|                         |                   | <b>M11 CHIR2-821.pro</b> |                 |
|                         |                   | <b>M11 CHIR2-820.pro</b> |                 |
| M11 CHIR2-791_nucleotid | } 2 Identische    | M11 CHIR2-791.pro        | } 3 Identische  |
| M11 CHIR2-714_nucleotid |                   | M11 CHIR2-714.pro        |                 |
|                         |                   | <b>M11 CHIR2-747.pro</b> |                 |
| M11 CHIR2-688_nucleotid | } 2 Identische    | M11 CHIR2-825.pro        | } 2 Identische  |
| M11 CHIR2-825_nucleotid |                   | M11 CHIR2-688.pro        |                 |
|                         |                   | <b>M11 CHIR2-676.pro</b> | } 2 Identische  |
|                         |                   | M11 CHIR2-710.pro        |                 |

**Abbildung 31: Vergleich aller auf Nukleotidebene identischen Sequenzen mit allen auf Proteinebene identischen Sequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11**

In der Abbildung sind die 52 Identischen auf Nukleotidebene mit ihren 13 Gruppen (in den linken beiden Spalten) und die 58 Identischen auf Proteinebene mit ihren 14 Gruppen (in den rechten beiden Spalten) wiedergegeben. Die 6 Sequenzen, die zwar auf Proteinebene einen oder mehrere Identische hatten, aber auf Nukleotidebene nicht, sind grau hinterlegt. Die 5 Sequenzen, die die 5 zusätzlichen Unterschiedlichen auf Nukleotidebene ausmachen, sind fett markiert.

|    | A                        | B          | C      | D                              |
|----|--------------------------|------------|--------|--------------------------------|
| 1  | Name                     | Sequenz    |        |                                |
| 2  | R11 CHIR2-958.pro        | LLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 3  | R11 CHIR2-880.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 4  | R11 CHIR2-833.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 5  | R11 CHIR2-956.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 6  | R11 CHIR2-945.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 7  | R11 CHIR2-876.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 8  | R11 CHIR2-932.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 9  | R11 CHIR2-861.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 10 | <b>R11 CHIR2-871.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH | } 1. Gruppe<br>(3 Identische)  |
| 11 | R11 CHIR2-927.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 12 | R11 CHIR2-952.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 13 | R11 CHIR2-898.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 14 | R11 CHIR2-981.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 15 | R11 CHIR2-973.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 16 | R11 CHIR2-831.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 17 | <b>R11 CHIR2-899.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH | } 2. Gruppe<br>(3 Identische)  |
| 18 | R11 CHIR2-961.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 19 | R11 CHIR2-978.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 20 | <b>R11 CHIR2-885.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH | } 3. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 21 | R11 CHIR2-967.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 22 | R11 CHIR2-960.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 23 | R11 CHIR2-931.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 24 | R11 CHIR2-836.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 25 | R11 CHIR2-994.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 26 | <b>R11 CHIR2-901.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH | } 4. Gruppe<br>(3 Identische)  |
| 27 | R11 CHIR2-935.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 28 | R11 CHIR2-963.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 29 | R11 CHIR2-957.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 30 | R11 CHIR2-884.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 31 | R11 CHIR2-938.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 32 | R11 CHIR2-944.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 33 | R11 CHIR2-897.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 34 | R11 CHIR2-969.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 35 | R11 CHIR2-828.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 36 | R11 CHIR2-870.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 37 | R11 CHIR2-954.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 38 | R11 CHIR2-903.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 39 | <b>R11 CHIR2-862.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH | } 5. Gruppe<br>(14 Identische) |
| 40 | R11 CHIR2-866.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 41 | R11 CHIR2-883.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 42 | R11 CHIR2-889.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 43 | R11 CHIR2-890.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 44 | R11 CHIR2-891.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 45 | R11 CHIR2-902.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 46 | R11 CHIR2-934.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 47 | R11 CHIR2-940.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 48 | R11 CHIR2-946.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 49 | R11 CHIR2-971.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 50 | R11 CHIR2-977.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 51 | R11 CHIR2-984.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 52 | R11 CHIR2-989.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 53 | R11 CHIR2-882.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 54 | R11 CHIR2-948.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH | } 6. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 55 | <b>R11 CHIR2-987.pro</b> | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 56 | R11 CHIR2-929.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |
| 57 | <b>R11 CHIR2-857.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH | } 7. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 58 | R11 CHIR2-860.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |                                |
| 59 | R11 CHIR2-986.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |                                |

ANHANG

CXXI

| A    | B                        | C          | D      |
|------|--------------------------|------------|--------|
| Name | Sequenz                  |            |        |
| 60   | R11 CHIR2-837.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 61   | <b>R11 CHIR2-881.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 62   | R11 CHIR2-941.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 63   | R11 CHIR2-942.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 64   | <b>R11 CHIR2-894.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 65   | R11 CHIR2-980.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 66   | R11 CHIR2-858.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 67   | R11 CHIR2-872.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 68   | R11 CHIR2-838.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 69   | R11 CHIR2-867.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 70   | R11 CHIR2-962.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 71   | R11 CHIR2-968.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 72   | R11 CHIR2-991.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 73   | R11 CHIR2-992.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 74   | R11 CHIR2-926.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 75   | R11 CHIR2-939.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 76   | R11 CHIR2-970.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 77   | <b>R11 CHIR2-832.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 78   | R11 CHIR2-835.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 79   | R11 CHIR2-859.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 80   | R11 CHIR2-863.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 81   | R11 CHIR2-865.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 82   | R11 CHIR2-933.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 83   | R11 CHIR2-937.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 84   | R11 CHIR2-975.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 85   | R11 CHIR2-976.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 86   | R11 CHIR2-928.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 87   | <b>R11 CHIR2-895.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 88   | R11 CHIR2-900.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 89   | R11 CHIR2-995.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 90   | R11 CHIR2-864.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 91   | R11 CHIR2-951.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 92   | <b>R11 CHIR2-888.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 93   | R11 CHIR2-953.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 94   | R11 CHIR2-972.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 95   | R11 CHIR2-950.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 96   | R11 CHIR2-879.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 97   | <b>R11 CHIR2-830.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 98   | R11 CHIR2-877.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 99   | R11 CHIR2-896.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 100  | R11 CHIR2-955.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 101  | R11 CHIR2-965.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 102  | R11 CHIR2-966.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 103  | R11 CHIR2-983.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 104  | R11 CHIR2-996.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 105  | R11 CHIR2-988.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 106  | R11 CHIR2-878.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 107  | R11 CHIR2-873.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 108  | R11 CHIR2-886.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 109  | R11 CHIR2-930.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 110  | <b>R11 CHIR2-834.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 111  | R11 CHIR2-874.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 112  | R11 CHIR2-925.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 113  | R11 CHIR2-959.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 114  | <b>R11 CHIR2-943.pro</b> | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 115  | R11 CHIR2-993.pro        | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 116  | R11 CHIR2-840.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |
| 117  | <b>R11 CHIR2-982.pro</b> | SLHPSQGVSL | WAHR   |
| 118  | R11 CHIR2-936.pro        | SLHPSQGVSL | FALSCH |

8. Gruppe  
(3 Identische)

9. Gruppe  
(2 Identische)

10. Gruppe  
(2 Identische)

11. Gruppe  
(9 Identische)

12. Gruppe  
(2 Identische)

13. Gruppe  
(2 Identische)

14. Gruppe  
(8 Identische)

15. Gruppe  
(2 Identische)

16. Gruppe  
(2 Identische)

17. Gruppe  
(2 Identische)

**Abbildung 32: Exceltabelle zur Darstellung der 117 Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie R11**

In Spalte A sind die Namen der 117 Proteinsequenzen, in Spalte B die zu Spalte A gehörige Sequenz, in Spalte C das Ergebnis des Vergleichs zwei aufeinander folgender Sequenzen und in Spalte D die 17 Gruppen der Identischen mit der Anzahl der Identischen pro Gruppe in Klammern wiedergegeben. Die Sequenzen in Spalte B sind aus Platzgründen nur in ihrem Anfangsbereich dargestellt. Spalte C Zeile n zeigt das Ergebnis der Formel „=identisch (B(n-1);Bn)“. Aufgrund der vorangegangenen Sortierung nach Spalte B sind die Sequenzen in Spalte B entsprechend ihrer Ähnlichkeit aufgereiht. Die Sequenzen, die fett markiert sind, stellen den Repräsentanten einer Gruppe von Identischen dar (s. 5.3.3.).



|    | A                       | B         | C      | D                            |
|----|-------------------------|-----------|--------|------------------------------|
| 1  | Name                    | Sequenz   |        |                              |
| 2  | R11 CHIR2-880_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 3  | R11 CHIR2-972_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 4  | R11 CHIR2-888_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 1. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 5  | R11 CHIR2-953_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 6  | R11 CHIR2-950_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 7  | R11 CHIR2-879_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 8  | R11 CHIR2-966_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 9  | R11 CHIR2-925_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 10 | R11 CHIR2-992_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 11 | R11 CHIR2-928_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 12 | R11 CHIR2-956_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 13 | R11 CHIR2-945_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 14 | R11 CHIR2-833_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 15 | R11 CHIR2-898_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 16 | R11 CHIR2-981_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 17 | R11 CHIR2-838_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 18 | R11 CHIR2-837_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 19 | R11 CHIR2-881_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 2. Gruppe<br>(3 Identische)  |
| 20 | R11 CHIR2-942_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 21 | R11 CHIR2-941_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   | 3. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 22 | R11 CHIR2-894_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 23 | R11 CHIR2-980_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 24 | R11 CHIR2-957_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 25 | R11 CHIR2-884_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 26 | R11 CHIR2-994_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 27 | R11 CHIR2-901_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 4. Gruppe<br>(3 Identische)  |
| 28 | R11 CHIR2-963_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 29 | R11 CHIR2-935_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 30 | R11 CHIR2-973_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 31 | R11 CHIR2-931_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 32 | R11 CHIR2-885_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 5. Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 33 | R11 CHIR2-967_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 34 | R11 CHIR2-899_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 6. Gruppe<br>(3 Identische)  |
| 35 | R11 CHIR2-978_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 36 | R11 CHIR2-961_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 37 | R11 CHIR2-960_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 38 | R11 CHIR2-831_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 39 | R11 CHIR2-836_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 40 | R11 CHIR2-897_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 41 | R11 CHIR2-969_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 42 | R11 CHIR2-989_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 43 | R11 CHIR2-828_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 44 | R11 CHIR2-902_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 7. Gruppe<br>(12 Identische) |
| 45 | R11 CHIR2-891_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 46 | R11 CHIR2-890_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 47 | R11 CHIR2-889_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 48 | R11 CHIR2-883_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 49 | R11 CHIR2-866_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 50 | R11 CHIR2-862_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 51 | R11 CHIR2-984_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 52 | R11 CHIR2-977_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 53 | R11 CHIR2-971_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 54 | R11 CHIR2-934_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 55 | R11 CHIR2-940_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                              |
| 56 | R11 CHIR2-903_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 57 | R11 CHIR2-954_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 58 | R11 CHIR2-870_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |
| 59 | R11 CHIR2-882_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                              |

|     | A                       | B         | C      | D                           |
|-----|-------------------------|-----------|--------|-----------------------------|
|     | Name                    | Sequenz   |        |                             |
| 60  | R11 CHIR2-987_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 8.Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 61  | R11 CHIR2-948_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                             |
| 62  | R11 CHIR2-929_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 9.Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 63  | R11 CHIR2-860_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                             |
| 64  | R11 CHIR2-857_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   | 9.Gruppe<br>(2 Identische)  |
| 65  | R11 CHIR2-944_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                             |
| 66  | R11 CHIR2-986_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                             |
| 67  | R11 CHIR2-938_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                             |
| 68  | R11 CHIR2-968_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                             |
| 69  | R11 CHIR2-932_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                             |
| 70  | R11 CHIR2-927_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH | 10.Gruppe<br>(3 Identische) |
| 71  | R11 CHIR2-871_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                             |
| 72  | R11 CHIR2-952_nucleotid | TCACTGCAC | WAHR   |                             |
| 73  | R11 CHIR2-861_nucleotid | TCACTGCAC | FALSCH |                             |
| 74  | R11 CHIR2-840_nucleotid | TCACTGTAC | FALSCH | 11.Gruppe<br>(2 Identische) |
| 75  | R11 CHIR2-982_nucleotid | TCACTGTAC | WAHR   |                             |
| 76  | R11 CHIR2-936_nucleotid | TCACTGTAC | FALSCH |                             |
| 77  | R11 CHIR2-993_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 78  | R11 CHIR2-943_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 79  | R11 CHIR2-886_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 80  | R11 CHIR2-878_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 81  | R11 CHIR2-896_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH | 12.Gruppe<br>(7 Identische) |
| 82  | R11 CHIR2-877_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 83  | R11 CHIR2-830_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 84  | R11 CHIR2-996_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 85  | R11 CHIR2-983_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 86  | R11 CHIR2-965_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 87  | R11 CHIR2-955_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 88  | R11 CHIR2-988_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 89  | R11 CHIR2-873_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 90  | R11 CHIR2-959_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 91  | R11 CHIR2-874_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH | 13.Gruppe<br>(2 Identische) |
| 92  | R11 CHIR2-834_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 93  | R11 CHIR2-930_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 94  | R11 CHIR2-939_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 95  | R11 CHIR2-991_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 96  | R11 CHIR2-951_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 97  | R11 CHIR2-900_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 98  | R11 CHIR2-933_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH | 14.Gruppe<br>(9 Identische) |
| 99  | R11 CHIR2-865_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 100 | R11 CHIR2-863_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 101 | R11 CHIR2-859_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 102 | R11 CHIR2-835_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 103 | R11 CHIR2-832_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 104 | R11 CHIR2-976_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 105 | R11 CHIR2-975_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 106 | R11 CHIR2-937_nucleotid | TCGCTGCAC | WAHR   |                             |
| 107 | R11 CHIR2-995_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 108 | R11 CHIR2-864_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 109 | R11 CHIR2-926_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 110 | R11 CHIR2-970_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 111 | R11 CHIR2-895_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 112 | R11 CHIR2-876_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 113 | R11 CHIR2-872_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 114 | R11 CHIR2-858_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 115 | R11 CHIR2-867_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 116 | R11 CHIR2-962_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 117 | R11 CHIR2-946_nucleotid | TCGCTGCAC | FALSCH |                             |
| 118 | R11 CHIR2-958_nucleotid | TTGCTGCAC | FALSCH |                             |

**Abbildung 33: Exceltabelle der 117 Nukleotidsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen aus dem Huhn der Linie R11**

In Spalte A sind die Namen der 117 Nukleotidsequenzen, in Spalte B die zu Spalte A gehörige Sequenz, in Spalte C das Ergebnis des Vergleichs zwei aufeinander folgender Sequenzen und in Spalte D die Gruppen der Identischen mit der Anzahl der Identischen pro Gruppe wiedergegeben. Die Sequenzen in Spalte B sind aus Platzgründen nur in ihrem Anfangsbereich dargestellt. Spalte C Zeile n zeigt das Ergebnis der Formel „=identisch (B(n-1);Bn)“. Aufgrund der vorangegangenen Sortierung nach Spalte B sind die Sequenzen in Spalte B entsprechend ihrer Ähnlichkeit aufgereiht.

|                         |                 |                          |                 |
|-------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| R11 CHIR2-927_nucleotid | } 3 Identische  | R11 CHIR2-927.pro        | } 3 Identische  |
| R11 CHIR2-871_nucleotid |                 | R11 CHIR2-871.pro        |                 |
| R11 CHIR2-952_nucleotid |                 | R11 CHIR2-952.pro        |                 |
| R11 CHIR2-899_nucleotid | } 3 Identische  | R11 CHIR2-899.pro        | } 3 Identische  |
| R11 CHIR2-978_nucleotid |                 | R11 CHIR2-978.pro        |                 |
| R11 CHIR2-961_nucleotid |                 | R11 CHIR2-961.pro        |                 |
| R11 CHIR2-885_nucleotid | } 2 Identische  | R11 CHIR2-885.pro        | } 2 Identische  |
| R11 CHIR2-967_nucleotid |                 | R11 CHIR2-967.pro        |                 |
| R11 CHIR2-901_nucleotid | } 3 Identische  | R11 CHIR2-901.pro        | } 3 Identische  |
| R11 CHIR2-963_nucleotid |                 | R11 CHIR2-963.pro        |                 |
| R11 CHIR2-935_nucleotid |                 | R11 CHIR2-935.pro        |                 |
| R11 CHIR2-902_nucleotid | } 12 Identische | R11 CHIR2-902.pro        | } 14 Identische |
| R11 CHIR2-891_nucleotid |                 | R11 CHIR2-891.pro        |                 |
| R11 CHIR2-890_nucleotid |                 | R11 CHIR2-890.pro        |                 |
| R11 CHIR2-889_nucleotid |                 | R11 CHIR2-889.pro        |                 |
| R11 CHIR2-883_nucleotid |                 | R11 CHIR2-883.pro        |                 |
| R11 CHIR2-866_nucleotid |                 | R11 CHIR2-866.pro        |                 |
| R11 CHIR2-862_nucleotid |                 | R11 CHIR2-862.pro        |                 |
| R11 CHIR2-984_nucleotid |                 | R11 CHIR2-984.pro        |                 |
| R11 CHIR2-977_nucleotid |                 | R11 CHIR2-977.pro        |                 |
| R11 CHIR2-971_nucleotid |                 | R11 CHIR2-971.pro        |                 |
| R11 CHIR2-934_nucleotid |                 | R11 CHIR2-934.pro        |                 |
| R11 CHIR2-940_nucleotid |                 | R11 CHIR2-940.pro        |                 |
|                         |                 | <b>R11 CHIR2-946.pro</b> |                 |
|                         |                 | <b>R11 CHIR2-989.pro</b> |                 |
| R11 CHIR2-987_nucleotid | } 2 Identische  | R11 CHIR2-987.pro        | } 2 Identische  |
| R11 CHIR2-948_nucleotid |                 | R11 CHIR2-948.pro        |                 |
| R11 CHIR2-860_nucleotid | } 2 Identische  | R11 CHIR2-860.pro        | } 2 Identische  |
| R11 CHIR2-857_nucleotid |                 | R11 CHIR2-857.pro        |                 |
| R11 CHIR2-881_nucleotid | } 3 Identische  | R11 CHIR2-881.pro        | } 3 Identische  |
| R11 CHIR2-942_nucleotid |                 | R11 CHIR2-942.pro        |                 |
| R11 CHIR2-941_nucleotid |                 | R11 CHIR2-941.pro        |                 |
| R11 CHIR2-894_nucleotid | } 2 Identische  | R11 CHIR2-894.pro        | } 2 Identische  |
| R11 CHIR2-980_nucleotid |                 | R11 CHIR2-980.pro        |                 |
|                         |                 | R11 CHIR2-838.pro        | } 2 Identische  |
|                         |                 | <b>R11 CHIR2-867.pro</b> |                 |
| R11 CHIR2-933_nucleotid | } 9 Identische  | R11 CHIR2-832.pro        | } 9 Identische  |
| R11 CHIR2-865_nucleotid |                 | R11 CHIR2-835.pro        |                 |
| R11 CHIR2-863_nucleotid |                 | R11 CHIR2-859.pro        |                 |
| R11 CHIR2-859_nucleotid |                 | R11 CHIR2-863.pro        |                 |
| R11 CHIR2-835_nucleotid |                 | R11 CHIR2-865.pro        |                 |
| R11 CHIR2-832_nucleotid |                 | R11 CHIR2-933.pro        |                 |
| R11 CHIR2-976_nucleotid |                 | R11 CHIR2-937.pro        |                 |
| R11 CHIR2-975_nucleotid |                 | R11 CHIR2-975.pro        |                 |
| R11 CHIR2-937_nucleotid |                 | R11 CHIR2-976.pro        |                 |
|                         |                 | R11 CHIR2-895.pro        | } 2 Identische  |
|                         |                 | <b>R11 CHIR2-900.pro</b> |                 |
| R11 CHIR2-888_nucleotid | } 2 Identische  | R11 CHIR2-888.pro        | } 2 Identische  |
| R11 CHIR2-953_nucleotid |                 | R11 CHIR2-953.pro        |                 |
| R11 CHIR2-896_nucleotid | } 7 Identische  | R11 CHIR2-896.pro        | } 8 Identische  |
| R11 CHIR2-877_nucleotid |                 | R11 CHIR2-877.pro        |                 |
| R11 CHIR2-830_nucleotid |                 | R11 CHIR2-830.pro        |                 |
| R11 CHIR2-996_nucleotid |                 | R11 CHIR2-996.pro        |                 |
| R11 CHIR2-983_nucleotid |                 | R11 CHIR2-983.pro        |                 |
| R11 CHIR2-965_nucleotid |                 | R11 CHIR2-965.pro        |                 |
| R11 CHIR2-955_nucleotid |                 | R11 CHIR2-955.pro        |                 |
|                         |                 | <b>R11 CHIR2-966.pro</b> |                 |
| R11 CHIR2-874_nucleotid | } 2 Identische  | R11 CHIR2-834.pro        | } 2 Identische  |
| R11 CHIR2-834_nucleotid |                 | R11 CHIR2-874.pro        |                 |
|                         |                 | R11 CHIR2-943.pro        | } 2 Identische  |
|                         |                 | <b>R11 CHIR2-993.pro</b> |                 |
| R11 CHIR2-840_nucleotid | } 2 Identische  | R11 CHIR2-840.pro        | } 2 Identische  |
| R11 CHIR2-982_nucleotid |                 | R11 CHIR2-982.pro        |                 |

**Abbildung 34: Vergleich aller auf Nukleotidebene identischen Sequenzen mit allen auf Proteinebene identischen Sequenzen der CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie R11**

In der Abbildung sind die 54 Identischen auf Nukleotidebene mit ihren 14 Gruppen (in den linken beiden Spalten) und die 63 Identischen auf Proteinebene mit ihren 17 Gruppen (in den rechten beiden Spalten) wiedergegeben. Die Sequenzen, die zwar auf Proteinebene einen oder mehrere Identische hatten, aber auf Nukleotidebene nicht, sind grau hinterlegt. Die 6 fett markierten Sequenzen sind die 6 Sequenzen, die die Differenz zwischen den 77 unterschiedlichen Sequenzen auf Nukleotidebene und den 71 unterschiedlichen Sequenzen auf Proteinebene ausmachen.

ANHANG

CXXVIII

|    | A                     | B             | C      | D              | E              | F                 | G                         |
|----|-----------------------|---------------|--------|----------------|----------------|-------------------|---------------------------|
| 1  | Name                  | Sequenz       |        | M11 Gruppen    | R11 Gruppen    | gemischte Gruppen | Gruppen dieses Vergleichs |
| 2  | M11 CHIR2-711_lg1.pro | LLHPIQRVSLGDM | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 3  | M11 CHIR2-768_lg1.pro | LLHPIQRVSLGDM | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 4  | M11 CHIR2-761_lg1.pro | LLHPIQRVSLGDM | WAHR   | 1.Gruppe M11   |                |                   | 1.Gruppe                  |
| 5  | M11 CHIR2-754_lg1.pro | LLHPIQRVSLGDM | FALSCH | (2 Identische) |                |                   | (2 Identische)            |
| 6  | M11 CHIR2-680_lg1.pro | LLHPSQGVPLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 7  | R11 CHIR2-958_lg1.pro | LLHPSQGVSLQD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 8  | M11 CHIR2-769_lg1.pro | SLHPIQRVSLGDI | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 9  | M11 CHIR2-688_lg1.pro | SLHPIQRVSLGDI | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 10 | M11 CHIR2-815_lg1.pro | SLHPIQRVSLGDI | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 11 | M11 CHIR2-718_lg1.pro | SLHPIQRVSLGDI | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 12 | M11 CHIR2-683_lg1.pro | SLHPSHGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 13 | M11 CHIR2-784_lg1.pro | SLHPSHGVSLGD  | FALSCH | 2.Gruppe M11   |                |                   | 2.Gruppe                  |
| 14 | M11 CHIR2-692_lg1.pro | SLHPSHGVSLGD  | WAHR   | (2 Identische) |                |                   | (2 Identische)            |
| 15 | M11 CHIR2-731_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | FALSCH | 3.Gruppe M11   |                |                   | 3.Gruppe                  |
| 16 | M11 CHIR2-693_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | WAHR   | (2 Identische) |                |                   | (2 Identische)            |
| 17 | M11 CHIR2-681_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 18 | M11 CHIR2-808_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 19 | M11 CHIR2-793_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 20 | M11 CHIR2-780_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | WAHR   |                |                |                   |                           |
| 21 | M11 CHIR2-726_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | WAHR   | 4.Gruppe M11   |                |                   | 4.Gruppe                  |
| 22 | M11 CHIR2-723_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | WAHR   | (6 Identische) |                |                   | (6 Identische)            |
| 23 | M11 CHIR2-676_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | WAHR   |                |                |                   |                           |
| 24 | M11 CHIR2-682_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | WAHR   |                |                |                   |                           |
| 25 | M11 CHIR2-823_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 26 | M11 CHIR2-810_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 27 | M11 CHIR2-779_lg1.pro | SLHPSQEVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 28 | M11 CHIR2-733_lg1.pro | SLHPSQGMSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 29 | M11 CHIR2-767_lg1.pro | SLHPSQGMSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 30 | M11 CHIR2-734_lg1.pro | SLHPSQGVPLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 31 | M11 CHIR2-770_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 32 | M11 CHIR2-809_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 33 | M11 CHIR2-789_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 34 | M11 CHIR2-802_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 35 | M11 CHIR2-787_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | WAHR   | 5.Gruppe M11   |                |                   | 5.Gruppe                  |
| 36 | M11 CHIR2-755_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | WAHR   | (5 Identische) |                |                   | (5 Identische)            |
| 37 | M11 CHIR2-720_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | WAHR   |                |                |                   |                           |
| 38 | M11 CHIR2-697_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | WAHR   |                |                |                   |                           |
| 39 | M11 CHIR2-783_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH | 6.Gruppe M11   |                |                   | 6.Gruppe                  |
| 40 | M11 CHIR2-708_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | WAHR   | (2 Identische) |                |                   | (2 Identische)            |
| 41 | M11 CHIR2-740_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 42 | M11 CHIR2-741_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 43 | M11 CHIR2-753_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 44 | M11 CHIR2-691_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 45 | M11 CHIR2-816_lg1.pro | SLHPSQGVSLAN  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 46 | M11 CHIR2-730_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 47 | M11 CHIR2-824_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 48 | M11 CHIR2-771_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH | 7.Gruppe M11   |                |                   | 7.Gruppe                  |
| 49 | M11 CHIR2-739_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | WAHR   | (3 Identische) |                |                   | (3 Identische)            |
| 50 | M11 CHIR2-698_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | WAHR   |                |                |                   |                           |
| 51 | M11 CHIR2-716_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 52 | M11 CHIR2-804_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 53 | R11 CHIR2-880_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 54 | R11 CHIR2-833_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 55 | R11 CHIR2-956_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                | 1.Gruppe R11   |                   | 8.Gruppe                  |
| 56 | R11 CHIR2-945_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | WAHR   |                | (2 Identische) |                   | (2 Identische)            |
| 57 | M11 CHIR2-805_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 58 | M11 CHIR2-735_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 59 | M11 CHIR2-758_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 60 | M11 CHIR2-792_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH | 8.Gruppe M11   |                |                   | 9.Gruppe                  |
| 61 | M11 CHIR2-677_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | WAHR   | (2 Identische) |                |                   | (2 Identische)            |
| 62 | M11 CHIR2-814_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 63 | M11 CHIR2-794_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 64 | R11 CHIR2-876_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 65 | M11 CHIR2-719_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 66 | M11 CHIR2-812_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 67 | R11 CHIR2-932_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 68 | M11 CHIR2-729_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 69 | R11 CHIR2-861_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 70 | R11 CHIR2-871_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 71 | M11 CHIR2-685_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |
| 72 | M11 CHIR2-721_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD  | FALSCH |                |                |                   |                           |

| A    | B                            | C                   | D           | E                               | F  | G                           |
|------|------------------------------|---------------------|-------------|---------------------------------|--|-----------------------------|
| Name | Sequenz                      |                     | M11 Gruppen | R11 Gruppen                     | gemischte Gruppen                              | Gruppen dieses Vergleichs   |
| 73   | R11 CHIR2-898_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 74   | R11 CHIR2-981_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 75   | M11 CHIR2-760_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 76   | M11 CHIR2-703_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 77   | R11 CHIR2-973_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 78   | R11 CHIR2-831_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 79   | R11 CHIR2-960_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 80   | R11 CHIR2-931_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        | 2.Gruppe R11<br>(5 Identische)  |  | 10.Gruppe<br>(5 Identische) |
| 81   | R11 CHIR2-899_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 82   | R11 CHIR2-885_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 83   | R11 CHIR2-836_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 84   | R11 CHIR2-994_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      | 3.Gruppe R11<br>(2 Identische)  |  | 11.Gruppe<br>(2 Identische) |
| 85   | R11 CHIR2-901_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 86   | R11 CHIR2-957_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 87   | R11 CHIR2-884_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 88   | M11 CHIR2-773_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 89   | M11 CHIR2-807_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 90   | M11 CHIR2-786_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 91   | M11 CHIR2-736_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        | 9.Gruppe M11<br>(3 Identische)  |  | 12.Gruppe<br>(3 Identische) |
| 92   | M11 CHIR2-700_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 93   | R11 CHIR2-938_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 94   | R11 CHIR2-944_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 95   | R11 CHIR2-897_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 96   | R11 CHIR2-969_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 97   | R11 CHIR2-846_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 98   | R11 CHIR2-828_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 99   | R11 CHIR2-987_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 100  | R11 CHIR2-954_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        | 4.Gruppe R11<br>(8 Identische)  |  | 13.Gruppe<br>(8 Identische) |
| 101  | R11 CHIR2-929_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 102  | R11 CHIR2-903_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 103  | R11 CHIR2-882_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 104  | R11 CHIR2-870_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 105  | R11 CHIR2-857_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 106  | R11 CHIR2-986_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 107  | M11 CHIR2-704_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 108  | M11 CHIR2-689_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 109  | M11 CHIR2-728_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 110  | M11 CHIR2-785_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 111  | M11 CHIR2-772_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 112  | <b>M11 CHIR2-687_lg1.pro</b> | <b>SLHPSQGVSLGD</b> | <b>WAHR</b> | 10.Gruppe M11<br>(3 Identische) |  |                             |
| 113  | M11 CHIR2-678_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 | 1.gemischte Gruppe<br>zwischen M11 und<br>R11  | 14.Gruppe<br>(6 Identische) |
| 114  | R11 CHIR2-837_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 115  | R11 CHIR2-894_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        | 5.Gruppe R11<br>(3 Identische)  |  |                             |
| 116  | <b>R11 CHIR2-881_lg1.pro</b> | <b>SLHPSQGVSLGD</b> | <b>WAHR</b> |                                 |  |                             |
| 117  | M11 CHIR2-751_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 118  | M11 CHIR2-732_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 119  | M11 CHIR2-764_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 120  | M11 CHIR2-819_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 121  | M11 CHIR2-791_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        | 11.Gruppe M11<br>(5 Identische) |  |                             |
| 122  | M11 CHIR2-782_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 123  | <b>M11 CHIR2-724_lg1.pro</b> | <b>SLHPSQGVSLGD</b> | <b>WAHR</b> |                                 | 2. gemischte Gruppe<br>zwischen M11 und<br>R11 | 15.Gruppe<br>(8 Identische) |
| 124  | <b>M11 CHIR2-694_lg1.pro</b> | <b>SLHPSQGVSLGD</b> | <b>WAHR</b> |                                 |  |                             |
| 125  | <b>R11 CHIR2-858_lg1.pro</b> | <b>SLHPSQGVSLGD</b> | <b>WAHR</b> |                                 |  |                             |
| 126  | <b>R11 CHIR2-838_lg1.pro</b> | <b>SLHPSQGVSLGD</b> | <b>WAHR</b> | 6.Gruppe R11<br>(3 Identische)  |  |                             |
| 127  | R11 CHIR2-872_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 128  | M11 CHIR2-707_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 129  | M11 CHIR2-813_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 130  | M11 CHIR2-806_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 131  | R11 CHIR2-962_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 132  | M11 CHIR2-795_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 133  | R11 CHIR2-968_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 134  | M11 CHIR2-801_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGN        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 135  | M11 CHIR2-822_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGN        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 136  | M11 CHIR2-743_lg1.pro        | SLHPSQGVSLGY        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 137  | R11 CHIR2-991_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 138  | R11 CHIR2-992_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 139  | R11 CHIR2-926_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 140  | R11 CHIR2-939_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 141  | R11 CHIR2-970_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 142  | R11 CHIR2-864_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | FALSCH      |                                 |  |                             |
| 143  | R11 CHIR2-832_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | WAHR        | 7.Gruppe R11<br>(5 Identische)  |  | 16.Gruppe<br>(5 Identische) |
| 144  | R11 CHIR2-995_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 145  | R11 CHIR2-928_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | WAHR        |                                 |  |                             |
| 146  | R11 CHIR2-895_lg1.pro        | SLHPSQGVSLQD        | WAHR        |                                 |  |                             |

|     | A                     | B            | C      | D           | E                            | F                                       | G                         |
|-----|-----------------------|--------------|--------|-------------|------------------------------|---|---------------------------|
|     | Name                  | Sequenz      |        | M11 Gruppen | R11 Gruppen                  | gemischte Gruppen                       | Gruppen dieses Vergleichs |
| 147 | R11 CHIR2-951_lg1.pro | SLHPSQGVSLQD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 148 | M11 CHIR2-811_lg1.pro | SLHPSQGVSLQD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 149 | M11 CHIR2-705_lg1.pro | SLHPSQGVSLQD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 150 | R11 CHIR2-888_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 151 | R11 CHIR2-972_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 152 | M11 CHIR2-725_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 153 | M11 CHIR2-827_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 154 | R11 CHIR2-950_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 155 | M11 CHIR2-765_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              | 3. gemischt Gruppe zwischen M11 und R11 | 17. Gruppe (4 Identische) |
| 156 | R11 CHIR2-830_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | WAHR   |             | 8. Gruppe R11 (3 Identische) |   |                           |
| 157 | R11 CHIR2-988_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | WAHR   |             |                              |   |                           |
| 158 | R11 CHIR2-879_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | WAHR   |             |                              |   |                           |
| 159 | R11 CHIR2-878_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 160 | R11 CHIR2-873_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 161 | R11 CHIR2-886_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 162 | R11 CHIR2-930_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 163 | R11 CHIR2-834_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 164 | R11 CHIR2-925_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 165 | R11 CHIR2-959_lg1.pro | SLHPSQGVSPGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 166 | R11 CHIR2-943_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 167 | M11 CHIR2-796_lg1.pro | SLHPSQGVSLGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 168 | M11 CHIR2-781_lg1.pro | SLYPSQGVSLGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 169 | R11 CHIR2-982_lg1.pro | SLYPSQGVSLGD | FALSCH |             |                              |   |                           |
| 170 | R11 CHIR2-936_lg1.pro | SLYPSQGVSLGD | FALSCH |             |                              |   |                           |

### Abbildung 35: Exceltabelle der 169 Ig1-Domänen

Diese 169 Ig1-Domänen stammen von den 98 Ig1-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 und den 71 Ig1-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11. Die 71 Ig1-Domänen des Huhns der Linie R11 sind im Namen und in der Sequenz grau hinterlegt. In Spalte A sind die Namen der Ig1-Domänen, in Spalte B die entsprechende Sequenz (aus Platzgründen nur in ihrem Anfangsteil) nach durchgeführter Sortierung nach der Sequenz wieder gegeben. Spalte C zeigt das Ergebnis der Formel „=identisch (B(n-1);Bn)“. In Spalte D sind die Gruppen der Identischen zwischen den 98 M11-Ig1-Domänen eingezeichnet (s. 5.3.6.). Spalte E gibt die Gruppen der Identischen zwischen den 71 R11- Ig1-Domänen wieder (s. 5.4.5.) In Spalte F sind die Gruppen bezeichnet, bei denen es identische Ig1-Domänen zwischen den beiden Hühnerlinien gibt. Spalte G zeigt die Gruppen des Vergleichs der 169 Ig1-Domänen. Fett markiert sind die 6 Sequenzen, die zwischen M11 und R11 auf Gesamtebene identisch sind. Zu beachten ist, dass 4 dieser Sequenzen („M11 CHIR2-724\_lg1.pro“ / „R11 CHIR2-838\_lg1.pro“ und „M11 CHIR2-694\_lg1.pro“ / „R11 CHIR2-858\_lg1.pro“) dieselbe Ig1-Domäne besitzen (s. „2. gemischte Gruppe zwischen M11 und R11“).



|    | A                            | B                | C             | D            | E            | F                  | G                         |
|----|------------------------------|------------------|---------------|--------------|--------------|--------------------|---------------------------|
| 1  | Name                         | Sequenz          |               | M11 Gruppen  | R11 Gruppen  | gemischte Gruppen  | Gruppen dieses Vergleichs |
| 2  | M11 CHIR2-823_lg2.pro        | DHQYFPPNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 3  | R11 CHIR2-962_lg2.pro        | DHQYSPPNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 4  | M11 CHIR2-730_lg2.pro        | DHQYSPPNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 5  | M11 CHIR2-824_lg2.pro        | DHQYSPPNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 6  | M11 CHIR2-813_lg2.pro        | DHRYFPPNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 7  | M11 CHIR2-806_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 8  | M11 CHIR2-791_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | WAHR          | 1.Gruppe M11 |              |                    | 1.Gruppe                  |
| 9  | M11 CHIR2-764_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | WAHR          | 4 Identische |              |                    | 4 Identische              |
| 10 | M11 CHIR2-731_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | WAHR          |              |              |                    |                           |
| 11 | M11 CHIR2-779_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        | 2.Gruppe M11 |              | 1.gemischte Gruppe | 2.Gruppe                  |
| 12 | <b>M11 CHIR2-694_lg2.pro</b> | <b>DHRYSPNNI</b> | <b>WAHR</b>   | 2 Identische |              | zwischen M11 und   | 3 Identische              |
| 13 | <b>R11 CHIR2-858_lg2.pro</b> | <b>DHRYSPNNI</b> | <b>WAHR</b>   |              |              | R11                |                           |
| 14 | M11 CHIR2-793_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        | 3.Gruppe M11 |              |                    | 3.Gruppe                  |
| 15 | M11 CHIR2-743_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | WAHR          | 2 Identische |              |                    | 2 Identische              |
| 16 | M11 CHIR2-758_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 17 | R11 CHIR2-872_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 18 | M11 CHIR2-693_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 19 | M11 CHIR2-819_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 20 | M11 CHIR2-689_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 21 | M11 CHIR2-732_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 22 | M11 CHIR2-726_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 23 | M11 CHIR2-723_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 24 | M11 CHIR2-810_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        | 4.Gruppe M11 |              |                    | 4.Gruppe                  |
| 25 | M11 CHIR2-782_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | WAHR          | 3 Identische |              |                    | 3 Identische              |
| 26 | M11 CHIR2-780_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | WAHR          |              |              |                    |                           |
| 27 | M11 CHIR2-676_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 28 | R11 CHIR2-958_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 29 | <b>M11 CHIR2-724_lg2.pro</b> | <b>DHRYSPNNI</b> | <b>FALSCH</b> | 5.Gruppe M11 |              | 2. gemischte       | 5.Gruppe                  |
| 30 | M11 CHIR2-704_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | WAHR          | 2 Identische |              | Gruppe zwischen    | 3 Identische              |
| 31 | <b>R11 CHIR2-838_lg2.pro</b> | <b>DHRYSPNNI</b> | <b>WAHR</b>   |              |              | M11 und R11        |                           |
| 32 | M11 CHIR2-682_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 33 | R11 CHIR2-959_lg2.pro        | DHRYSPNNI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 34 | R11 CHIR2-884_lg2.pro        | DHSYSPPSI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 35 | M11 CHIR2-814_lg2.pro        | DLKYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 36 | R11 CHIR2-970_lg2.pro        | DLRFPPPSI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 37 | M11 CHIR2-725_lg2.pro        | DLRYPPCRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 38 | M11 CHIR2-767_lg2.pro        | DLRYPPSAI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 39 | R11 CHIR2-831_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 40 | R11 CHIR2-944_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              | 1.Gruppe R11 |                    | 6.Gruppe                  |
| 41 | R11 CHIR2-871_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          |              | 2 Identische |                    | 2 Identische              |
| 42 | M11 CHIR2-708_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 43 | R11 CHIR2-969_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 44 | R11 CHIR2-982_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              | 2.Gruppe R11 |                    | 7.Gruppe                  |
| 45 | R11 CHIR2-973_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          |              | 3 Identische |                    | 3 Identische              |
| 46 | R11 CHIR2-880_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          |              |              |                    |                           |
| 47 | M11 CHIR2-754_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 48 | M11 CHIR2-677_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 49 | M11 CHIR2-784_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 50 | M11 CHIR2-692_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 51 | M11 CHIR2-794_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 52 | M11 CHIR2-685_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 53 | M11 CHIR2-805_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 54 | M11 CHIR2-741_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 55 | M11 CHIR2-721_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        | 6.Gruppe M11 |              |                    | 8.Gruppe                  |
| 56 | M11 CHIR2-707_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          | 2 Identische |              |                    | 2 Identische              |
| 57 | M11 CHIR2-733_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 58 | R11 CHIR2-991_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              | 3.Gruppe R11 |                    | 9.Gruppe                  |
| 59 | R11 CHIR2-951_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          |              | 4 Identische |                    | 4 Identische              |
| 60 | R11 CHIR2-899_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          |              |              |                    |                           |
| 61 | R11 CHIR2-836_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          |              |              |                    |                           |
| 62 | R11 CHIR2-885_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 63 | R11 CHIR2-960_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 64 | R11 CHIR2-936_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 65 | R11 CHIR2-925_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 66 | M11 CHIR2-795_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 67 | R11 CHIR2-931_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 68 | M11 CHIR2-700_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        |              |              |                    |                           |
| 69 | M11 CHIR2-786_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | FALSCH        | 7.Gruppe M11 |              |                    | 10.Gruppe                 |
| 70 | M11 CHIR2-773_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          | 3 Identische |              |                    | 3 Identische              |
| 71 | M11 CHIR2-691_lg2.pro        | DLRYPPSRI        | WAHR          |              |              |                    |                           |

|     | A                            | B                | C           | D                              | E                             | F  | G                          |  |
|-----|------------------------------|------------------|-------------|--------------------------------|-------------------------------|--|----------------------------|--|
|     | Name                         | Sequenz          |             | M11 Gruppen                    | R11 Gruppen                   | gemischte Gruppen                              | Gruppen dieses Vergleichs  |  |
| 72  | M11 CHIR2-736_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 73  | M11 CHIR2-792_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 74  | R11 CHIR2-828_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 75  | R11 CHIR2-870_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 76  | R11 CHIR2-932_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 77  | R11 CHIR2-954_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 78  | R11 CHIR2-903_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 79  | R11 CHIR2-992_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                | 4. Gruppe R11<br>7 Identische |  | 11. Gruppe<br>7 Identische |  |
| 80  | R11 CHIR2-986_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 81  | R11 CHIR2-950_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 82  | R11 CHIR2-938_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 83  | R11 CHIR2-897_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 84  | R11 CHIR2-861_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 85  | R11 CHIR2-846_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 86  | R11 CHIR2-882_lg2.pro        | DLRYPPSSIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 87  | M11 CHIR2-796_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 88  | M11 CHIR2-761_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 89  | M11 CHIR2-711_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 90  | M11 CHIR2-681_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | FALSCH      | 8. Gruppe M11<br>2 Identische  |                               |  | 12. Gruppe<br>2 Identische |  |
| 91  | M11 CHIR2-769_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 92  | M11 CHIR2-735_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 93  | M11 CHIR2-768_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 94  | M11 CHIR2-740_lg2.pro        | DLSFPPPCIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 95  | R11 CHIR2-943_lg2.pro        | DLSFPPPGIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 96  | M11 CHIR2-688_lg2.pro        | DLSFPPPGIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 97  | M11 CHIR2-815_lg2.pro        | DLSFPPPGIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 98  | M11 CHIR2-804_lg2.pro        | DLSFPPPHIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 99  | M11 CHIR2-739_lg2.pro        | DLSFPPPHIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 100 | M11 CHIR2-811_lg2.pro        | DLSFPPSGL        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 101 | M11 CHIR2-816_lg2.pro        | DRIFPPPGF        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 102 | M11 CHIR2-822_lg2.pro        | DRIFPPPGIS       | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 103 | R11 CHIR2-837_lg2.pro        | DRNFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 104 | M11 CHIR2-781_lg2.pro        | DRNFPPPHI        | FALSCH      | 9. Gruppe M11<br>2 Identische  |                               | 3. gemischte Gruppe<br>zwischen M11 und<br>R11 | 13. Gruppe<br>5 Identische |  |
| 105 | <b>M11 CHIR2-687_lg2.pro</b> | <b>DRNFPPPHI</b> | <b>WAHR</b> |                                |                               |  |                            |  |
| 106 | R11 CHIR2-968_lg2.pro        | DRNFPPPHI        | WAHR        |                                | 5. Gruppe R11<br>3 Identische |  |                            |  |
| 107 | <b>R11 CHIR2-881_lg2.pro</b> | <b>DRNFPPPHI</b> | <b>WAHR</b> |                                |                               |  |                            |  |
| 108 | R11 CHIR2-878_lg2.pro        | DRNFPPPHI        | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 109 | M11 CHIR2-772_lg2.pro        | DRNFPPPHI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 110 | M11 CHIR2-728_lg2.pro        | DRNFPPPHI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 111 | R11 CHIR2-873_lg2.pro        | DRNFPPPHI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 112 | M11 CHIR2-678_lg2.pro        | DRNFPPPHI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 113 | M11 CHIR2-683_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 114 | M11 CHIR2-716_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 115 | M11 CHIR2-802_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 116 | M11 CHIR2-787_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 117 | M11 CHIR2-718_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 118 | M11 CHIR2-760_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 119 | M11 CHIR2-703_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 120 | M11 CHIR2-789_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 121 | M11 CHIR2-770_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | WAHR        | 10. Gruppe M11<br>5 Identische |                               |  | 14. Gruppe<br>5 Identische |  |
| 122 | M11 CHIR2-734_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 123 | M11 CHIR2-729_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 124 | M11 CHIR2-697_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 125 | M11 CHIR2-720_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 126 | M11 CHIR2-719_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 127 | M11 CHIR2-755_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 128 | M11 CHIR2-801_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 129 | R11 CHIR2-886_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 130 | R11 CHIR2-857_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                | 6. Gruppe R11<br>2 Identische |  | 15. Gruppe<br>2 Identische |  |
| 131 | R11 CHIR2-832_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | WAHR        |                                |                               |  |                            |  |
| 132 | R11 CHIR2-928_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 133 | R11 CHIR2-895_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 134 | R11 CHIR2-926_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 135 | M11 CHIR2-705_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 136 | R11 CHIR2-995_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 137 | R11 CHIR2-864_lg2.pro        | DRSFPPPGI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 138 | M11 CHIR2-785_lg2.pro        | DRSFPPPHI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 139 | M11 CHIR2-751_lg2.pro        | DRSFPPPHI        | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 140 | M11 CHIR2-771_lg2.pro        | DRSLLPHI         | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |
| 141 | R11 CHIR2-994_lg2.pro        | DRSLLPHI         | FALSCH      |                                |                               |  |                            |  |

|     | A                     | B         | C      | D           | E             | F                                     | G                         |
|-----|-----------------------|-----------|--------|-------------|---------------|---------------------------------------|---------------------------|
|     | Name                  | Sequenz   |        | M11 Gruppen | R11 Gruppen   | gemischte Gruppen                     | Gruppen dieses Vergleichs |
| 142 | M11 CHIR2-698_lg2.pro | DRSLLPPIH | FALSCH |             |               | 4.gemischte Gruppe<br>zw. M11 und R11 | 16.Gruppe<br>2 Identische |
| 143 | R11 CHIR2-901_lg2.pro | DRSLLPPIH | WAHR   |             |               |                                       |                           |
| 144 | M11 CHIR2-827_lg2.pro | DVKYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 145 | M11 CHIR2-812_lg2.pro | DVKYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 146 | R11 CHIR2-956_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             | 7.Gruppe R11  |                                       | 17.Gruppe<br>2 Identische |
| 147 | R11 CHIR2-833_lg2.pro | DVRYPPSSI | WAHR   |             | 2 Identische  |                                       |                           |
| 148 | R11 CHIR2-987_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 149 | R11 CHIR2-981_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             | 8.Gruppe R11  |                                       | 18.Gruppe<br>2 Identische |
| 150 | R11 CHIR2-898_lg2.pro | DVRYPPSSI | WAHR   |             | 2 Identische  |                                       |                           |
| 151 | R11 CHIR2-930_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 152 | M11 CHIR2-680_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 153 | M11 CHIR2-765_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 154 | R11 CHIR2-939_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 155 | M11 CHIR2-753_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               | 5.gemischte Gruppe<br>zw. M11 und R11 | 19.Gruppe<br>2 Identische |
| 156 | R11 CHIR2-879_lg2.pro | DVRYPPSSI | WAHR   |             |               |                                       |                           |
| 157 | R11 CHIR2-957_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             | 9.Gruppe R11  |                                       | 20.Gruppe<br>2 Identische |
| 158 | R11 CHIR2-830_lg2.pro | DVRYPPSSI | WAHR   |             | 2 Identische  |                                       |                           |
| 159 | R11 CHIR2-988_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 160 | R11 CHIR2-972_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             | 10.Gruppe R11 |                                       | 21.Gruppe<br>2 Identische |
| 161 | R11 CHIR2-888_lg2.pro | DVRYPPSSI | WAHR   |             | 2 Identische  |                                       |                           |
| 162 | R11 CHIR2-876_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             | 11.Gruppe R11 |                                       | 22.Gruppe<br>2 Identische |
| 163 | R11 CHIR2-834_lg2.pro | DVRYPPSSI | WAHR   |             | 2 Identische  |                                       |                           |
| 164 | R11 CHIR2-929_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 165 | M11 CHIR2-783_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 166 | R11 CHIR2-945_lg2.pro | DVRYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 167 | R11 CHIR2-894_lg2.pro | GENTGTVD  | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 168 | M11 CHIR2-809_lg2.pro | NHRYSPPI  | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 169 | M11 CHIR2-808_lg2.pro | NHRYSPPI  | FALSCH |             |               |                                       |                           |
| 170 | M11 CHIR2-807_lg2.pro | NLKYPPSSI | FALSCH |             |               |                                       |                           |

**Abbildung 36: Exceltabelle der 169 Ig2-Domänen**

Diese 169 Ig2-Domänen stammen von den 98 Ig2-Domänen der 98 unterschiedlichen Proteinsequenzen von CHIRs mit 2 Ig-Domänen des Huhns der Linie M11 und den 71 Ig2-Domänen der 71 unterschiedlichen Proteinsequenzen des Huhns der Linie R11. Die 71 Ig2-Domänen des Huhns der Linie R11 sind im Namen und in der Sequenz grau hinterlegt. In Spalte A sind die Namen der Ig2-Domänen, in Spalte B die entsprechende Sequenz (aus Platzgründen nur in ihrem Anfangsteil) nach durchgeführter Sortierung nach der Sequenz wieder gegeben. Spalte C zeigt das Ergebnis der Formel „=identisch (B(n-1);Bn)“. In Spalte D sind die Gruppen der Identischen zwischen den 98 M11-Ig2-Domänen eingezeichnet (s. 5.3.7.). Spalte E gibt die Gruppen der Identischen zwischen den 71 R11-Ig2-Domänen wieder (s. 5.4.6.) In Spalte F sind die Gruppen bezeichnet, bei denen es identische Ig2-Domänen zwischen den beiden Hühnerlinien gibt. Spalte G zeigt die Gruppen des Vergleichs der 169 Ig2-Domänen. Fett markiert sind die 6 Sequenzen, die zwischen M11 und R11 auf full-length-Ebene identisch sind.

## Anhang II: Bezugsquellen der Materialien und Chemikalien

Die Bezugsquellen der Materialien und Chemikalien wurden als Hochzahlen entsprechend der folgenden Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden, angegeben:

|    |  |
|----|--|
| 1  | AppliChem, Darmstadt                                     |
| 2  | Biochrom, Berlin   |
| 3  | Biontix, München   |
| 4  | Greiner, Frickenhausen                                   |
| 5  | Hauptner, Solingen                                       |
| 6  | Invitrogen, Karlsruhe                                    |
| 7  | Macherey-Nagel, Düren                                    |
| 8  | Merck, Darmstadt   |
| 9  | MWG, Ebersberg   |
| 10 | NeoLab, Heidelberg                                       |
| 11 | Nunc, Langenselbold                                      |
| 12 | Peqlab Biotechnologie, Erlangen                          |
| 13 | Ratiopharm, Ulm  |
| 14 | Sarstedt, Nümbrecht                                      |
| 15 | Sigma, Deisenhofen                                       |
| 16 | Solis Biodyne, Tartu, Estland                            |
| 17 | Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA |
| 18 | Stratagene, Amsterdam, Niederlande                       |
| 19 | Fermentas, St. Leon-Rot                                  |

**Tabelle 5: Bezugsquellen der Materialien und Chemikalien**

Die Zahlen in der ersten Spalte entsprechen den Hochzahlen im Material- und Methoden-Teil.

## Anhang III: Geräte in alphabetischer Reihenfolge

| Gerät  | Bezeichnung  | Herstellerfirma   |
|--|--|---|
| Wasserbad in der Zellkultur                  | TYP 3047   | Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen                   |
| Zentrifuge in der Zellkultur                 | GS-6KR Centrifuge  | Beckmann, München   |
| Brutschrank in der Zellkultur                | Galaxy R Co2 Inkubator                                   | Nunc, Wiesbaden   |
| Durchflusszytometer                          | FACScalibur Software: BD<br>CellQuest™ Pro Version 4.0.2 | Becton Dickinson, Heidelberg                              |
| Gel Dokumentation                            | Gel Doc 2000 Software: Quantity One<br>4.1.1             | Bio-Rad, München  |
| Gel Dokumentation neu                        | Image Quant 300  | GE, München   |
| Elektroporator                               | Gene Pulser II   | Bio-Rad, München  |
| Mikroskop in der Zellkultur                  | Ortholux   | Leitz, Wetzlar  |
| Mikroskop in der Zellkultur                  | Wilovert   | Will, Wetzlar   |
| Mikrozentrifuge                              | Centrifuge 5415 R  | Eppendorf, Köln   |
| Photometer                                   | Biophotometer  | Eppendorf, Köln   |
| Photometer-Küvette                           | Quartz-Küvette QS 10.00mm                                | Hellma, Müllheim  |
| Photometer-Küvette                           | Küvette 220-1600nm                                       | Eppendorf, Köln   |
| Platten-Photometer                           | Sunrise Remote   | Tecan, Crailsheim   |
| Power-Supply für<br>Agarosegelelektrophorese | Power Pac 300  | Bio-Rad, München  |
| magnetischer Heizrührer                      | IKA-Combimag RCT   | Janke & Kunkel GmbH&CoKG, IKA-Werk<br>Staufen i. Breisgau |
| Sterile Werkbank im Labor                    | Helios 48  | Biohit, Mailand   |
| Sterile Werkbank in der Zellkultur           | Astec Microflow  | Nunc, Wiesbaden   |
| Thermocycler                                 | T3 Thermoblock   | Biometra, Göttingen                                       |
| Zählkammer                                   | Modifizierte Zählkammer nach<br>Neubauer                 | Brand, Wertheim   |
| Einfrierbox                                  | Cryo   | Nalgene, Nalge Nunc Rochester. U.S.A.                     |
| Pipetten                                     | Pipetman   | Gilson, Limburg-Offheim                                   |
| Universalschüttler mit<br>Inkubationshaube   | SM-30 CONTROL, TH 30                                     | Edmund Bühler, Hechingen                                  |
| Mikrowelle                                   | MicroChef 750W   | Moulinex  |
| Brutschrank im Labor                         |  | Memmert, Schwabach  |
| Zentrifuge im Labor                          | Megafuge 1.0R  | Heraeus Instruments, Hanau                                |
| Zentrifuge im Labor Deeg                     | Centrifuge 5810R   | Eppendorf, Köln   |
| Wasserbad im Labor                           | M3   | MGW Lauda, Lauda-Königshofen                              |
| Analysewaage                                 | AC100  | Mettler, Giessen  |
| Waage  | PC400  | Mettler, Giessen  |

**Tabelle 6: Liste der in dieser Doktorarbeit verwendeten Geräte**

## **Danksagung**

Für die guten Vorlesungen, die bei mir das Interesse an dem Fachgebiet der Immunologie geweckt haben, und die Überlassung des Themas gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. T.Göbel.

Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Bei Frau Dr. B. Viertböck bedanke ich mich für die anfängliche gute Einarbeitung, das teilweise Korrekturlesen dieser Arbeit und die Beantwortung einiger Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Ramona Schmitt für die ausgezeichnete Einarbeitung in alle Methoden, ein immer offenes Ohr für fachliche Fragen, ihre stete Anwesenheit und Hilfsbereitschaft - in besonderem an Dienstagabenden -, für Spielabende oder griechische Nächte, für aufmunternde Worte oder das „eckige Etwas“. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Carsten Krohmann und Matthias Hanczaruk danke ich für den Spaß im Labor, außer-uni-liche Aktivitäten und ihr im-Leben-Stehen. Frau Beatrice Schaerer möchte ich für gute Gespräche vielmals danken. Hanna Zipplies danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in allen Fragen rund um das Schreiben.

Auch möchte ich der Rechnerbetriebsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft bei allen erdenklichen Fragen rund um das Thema Computer danken.

Meinen Eltern danke ich für ihre immer da gewesene Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Menschlichkeit und ihre Herzlichkeit. Meiner Oma danke ich überdies für tägliche Gespräche, für das up-to-date-Halten über die Olympiaergebnisse und das Versprechen, gewissen Personen die Meinung zu sagen.

Für Brezenknödel, Risotto, Polenta, für die jahrelange Hilfe bei jeglichen Fragen, seien sie privat oder fachlich, für das durchs-Leben-Begleiten, das Leben erst lebenswert machen und die Unterstützung beim Nichtverlieren des Glaubens an das Gute danke ich meinem Freund.

Familie Knoll, Mephi, Nepomuk und Rayano danke ich für die sehr schöne Zeit.