

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

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

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

Mutationsanalyse der Interaktion zwischen IgY und CHIR-AB1

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

von
Jana Pürzel
aus
Werdau

München 2009

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. Dr. Erhard
Priv.-Doz. Dr. Deeg
Univ.-Prof. Dr. El-Matbouli
Univ.-Prof. Dr. Braun

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

**Für meine Familie
und
für Thomas**

Inhaltsverzeichnis

1	Literaturübersicht	1
1.1	Fc-Rezeptoren.....	2
1.1.1	humane Fc-Rezeptoren.....	3
1.1.1.1	F γ Rs	4
1.1.1.2	F ϵ RI.....	4
1.1.1.3	F α RI.....	5
1.1.2	Hühner Fc-Rezeptoren.....	5
1.1.2.1	FcRY.....	5
1.1.2.2	GgFcR.....	6
1.1.2.3	CHIR-AB1.....	6
1.2	Immunglobuline.....	6
1.2.1	humanes IgG.....	7
1.2.2	humanes IgE.....	7
1.2.3	humanes IgA.....	8
1.2.4	Hühner IgY.....	8
1.3	Vergleich der einzelnen Bindungsarten.....	9
1.4	Bedeutung der Zuckerreste.....	9
2	Publikation	11
3	Diskussion	17
4	Zusammenfassung	21
5	Summary	22
6	Literaturverzeichnis	23
7	Persönliche Daten	25

Abkürzungsverzeichnis

CH	konstante Domäne der schweren Kette eines Immunglobulin-Moleküls
CHIR	Chicken Ig-ähnliche Rezeptor (engl. <i>chicken Ig-like receptor</i>)
C-terminal	carboxyl-terminale Region eines Proteins
Fc-Fragment	konstante Region der schweren Kette eines Immunglobulin-Moleküls
FcR	Fc-Rezeptor
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
GgFcR	gallus gallus Fc-Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv
KIR	Killer Zelle Ig-ähnlicher Rezeptor (engl. <i>killer Ig-like receptor</i>)
LILR	Leukozyten Ig-ähnlicher Rezeptor (engl. <i>leukocyte Ig-like receptor</i>)
LRC	Leukozyten Rezeptor Cluster (engl. <i>Leukocyte Receptor Cluster</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
N-terminal	amino-terminale Region eines Proteins
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
VH	variable Domäne der schweren Kette eines Immunglobulin-Moleküls

1 Literaturübersicht

Viele immunregulatorische Zelloberflächenproteine wurden in den vergangenen Jahren beschrieben. Sie werden von Multigenfamilien kodiert, die auf verschiedenen Chromosomen liegen und enthalten sowohl hemmende als auch aktivierende Familienmitglieder. Hemmende Rezeptoren haben lange zytoplasmatische Enden mit Immunrezeptor Tyrosin-basierten inhibitorischen Motiven (ITIMs), während aktivierende Rezeptoren nur kurze zytoplasmatische Enden besitzen, aber eine basische Aminosäure in der transmembranen Region, welche mit einem Immunrezeptor Tyrosin-basierten aktivierenden Motiv (ITAM)-beinhaltenden Adaptermolekül, wie zum Beispiel der γ -Kette, DAP12 oder CD3 ζ interagiert. Der extrazelluläre Teil der Rezeptoren stellt sich entweder als C-Typ Lektinstruktur oder als Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen, in unterschiedlicher Anzahl, dar [1]. Immunregulatorischen Familien mit Ig-ähnlichen Domänen sind auf verschiedenen Immunzellen exprimiert. Bei einigen dieser Rezeptoren sind die Liganden noch nicht bekannt. Eine Ausnahme bildet hier die Familie der klassischen Fc-Rezeptoren (FcRs). Bei Säugern wurden die FcRs, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), schon lange als spezifisch für die verschiedenen Antikörper-Klassen charakterisiert. Bei ihnen konnte die Bindung an die konstante Region verschiedener Igs, wie IgG, IgE und IgA, nachgewiesen werden [2].

Der Ursprung der IgSF FcRs ist nicht klar, es wird angenommen, dass diese Rezeptoren evolutionär vom Leukozyten Rezeptor Cluster (LRC) abstammen. Wenige FcRs, unter anderem Fc α RI, sind tatsächlich noch im LRC konserviert [3]. Dies ist eine konservierte genomische Region, welche eine große Anzahl von IgSF-Rezeptoren exprimiert, die alle von einem gemeinsamen Vorläufer abzustammen scheinen. Beim Mensch gehören zu diesen Genen auch die sog. Killer Zellen Ig-ähnlichen Rezeptoren (KIRs), die Leukozyten Ig-ähnliche Rezeptoren (LILRs) und der Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen)-aktivierende Rezeptor NKp46 [4]. Während der LRC auf Chromosom 19 liegt, sind die meisten FcR-Gene beim Mensch jedoch auf Chromosom 1 lokalisiert [5].

Eine andere große immunregulatorische Ig-ähnliche Rezeptorfamilie, wird beim Huhn durch die Chicken Ig-ähnlichen Rezeptoren (CHIRs) gebildet [6]. Diese Gene liegen bei Hühnern im LRC auf dem Chromosom 31 [7] und sind somit wahrscheinlich Homologe der LILRs, KIRs oder anderer im LRC der Säuger kodierten Gene.

Kürzlich konnte ein Mitglied der CHIR-Familie, CHIR-AB1, als hoch affiner Rezeptor für IgY, dem aviären Homolog zu IgG, identifiziert werden [8].

Anders als bei Säuger FcRs, welche zwei oder drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen vom C2-Typ und nur aktivierende oder hemmende Motive besitzen, weist CHIR-AB1 nur eine Ig-ähnliche Domäne vom C2-Typ auf und ist als bifunktionaler Rezeptor klassifiziert. Diese potentielle Bifunktionalität kommt zum einen durch die geladene Aminosäure im transmembranen Bereich und zum anderen durch ein ITIM am zytoplasmatischen Ende zustande. Obwohl die Struktur der Ektodomäne von CHIR-AB1 den Ig-ähnlichen Domänen, welche in anderen Immunrezeptoren vorkommen sehr ähnelt, unterscheidet es sich doch deutlich von menschlichen FcRs und LRC-Mitgliedern, und zwar in der Fähigkeit Homodimere zu bilden [9].

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen CHIR-AB1 und IgY näher zu untersuchen, wobei spezielles Augenmerk auf wichtige Aminosäurenreste im IgY gelegt wurde, die für die Bindung eine Rolle spielen könnten. In den Vorüberlegungen wurden folgende Tatsachen berücksichtigt: Nachdem ein gemeinsamer Vorfahre von IgY als Vorläufer vom humanen IgG und IgE angesehen wird [10], ist es wahrscheinlich, dass IgY eine ähnliche Interaktionsstelle zum FcR, nämlich im N-terminalen Bereich zeigt. Um vorerst die in die Bindung involvierten Domänen zu definieren, wurden verschiedene IgY-Fc-Konstrukte entwickelt. Jedoch konnte schon in ersten Versuchen gezeigt werden, dass sich die Bindungsstelle im C-terminalen Bereich befindet (Abbildung 1 Publikation). Diese Art der Bindung wurde auch für die IgA1-Fc α RI-Interaktion beschrieben [11]. Dies schien insofern nicht verwunderlich, da CHIR-AB1 genau wie der menschliche Fc α R im LRC lokalisiert ist [6, 8, 12] und somit eine offensichtliche Verwandtschaft zwischen den beiden FcRs besteht.

1.1 Fc-Rezeptoren

Die Bindung von Antikörpern mit FcRs induziert entzündliche Immunreaktionen, vermittelt durch Makrophagen, Mastzellen, Neutrophile und NK-Zellen [13]. Allerdings lösen FcRs nicht nur Immunantworten aus, sie kontrollieren und limitieren auch deren Ausmaß [14]. In Anbetracht ihrer verschiedenen Aufgaben, ist ein detailliertes Verständnis über die Struktur und Funktion der einzelnen FcRs wichtig. Mit Hilfe aktueller Kristallographiedaten konnten einige dieser Strukturen, zum Teil auch im Komplex mit den entsprechenden Igs, entschlüsselt werden [9].

Im Folgenden soll auf die Struktur der Ektodomänen und die Bindungsart einiger, für diese Arbeit relevanter, FcRs näher eingegangen werden (Abbildung 1-1).

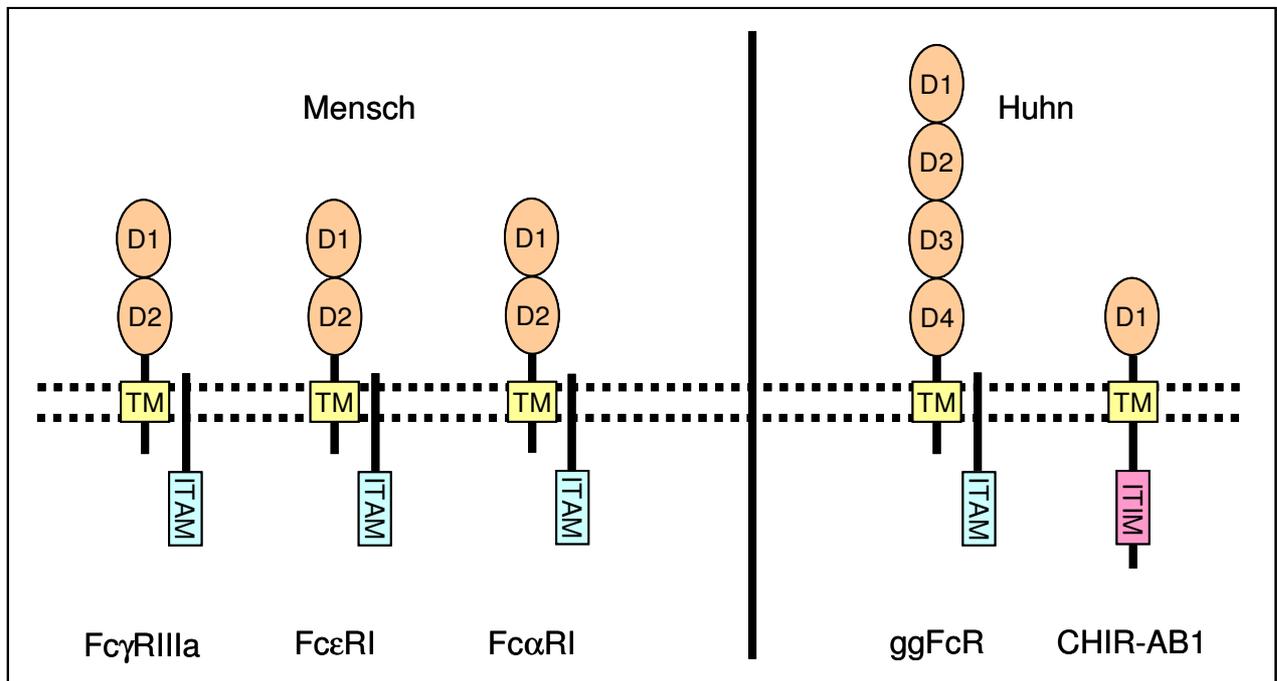


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der FcRs. Für FcγRIII wurde der aktivierende (a) Rezeptor dargestellt.

1.1.1 humane Fc-Rezeptoren

Beim Mensch existieren für IgG drei verschiedene Klassen an FcγRs, FcγRI, FcγRII und FcγRIII [15]. Für IgE existiert neben dem hoch affinen FcεRI zwar auch noch ein schwach affiner Rezeptor, der sog. FcεRII [16], auf diesen soll allerdings nicht weiter eingegangen werden. Der einzige gut charakterisierte Rezeptor für IgA ist FcαRI [12].

Aktuelle Kristallographiedaten zeigen jeweils ähnliche Strukturen. Sie besitzen alle je zwei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen, die mit D1 und D2 bzw. mit membrandistaler und membranproximaler Domäne bezeichnet werden [9].

Generell unterscheiden sich FcRs jedoch in der Präferenz ihres Liganden, in ihrer Bindungsaffinität und in ihren Signaleigenschaften [17].

Im Folgenden sollen die für diese Arbeit relevanten Rezeptoren näher beschrieben werden.

1.1.1.1 Fc γ Rs

Für IgG konnten drei verschiedene Klassen von Fc γ Rs charakterisiert werden. Der hoch affine Fc γ RI (CD64) ist insofern ungewöhnlich, da er drei extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen besitzt während die übrigen Fc γ Rs nur zwei besitzen. Fc γ RII (CD32) ist ein mittel affiner Rezeptor und Fc γ RIII (CD16) bindet IgG mit geringer bis mittlerer Affinität. Exprimiert werden diese Rezeptoren unter anderem auf Monozyten und Makrophagen, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß [16].

Die Interaktionsstelle von Fc γ RI und IgG liegt in der N-terminalen Region der C γ 2-Domäne, innerhalb der so genannten lower-hinge Region [18]. Dieselbe Region ist auch für die Bindung von Fc γ RII wichtig [19]. Mehr als ein Jahrzehnt nachdem die Bindungsstelle für Fc γ RI und Fc γ RII an IgG charakterisiert wurde, konnte die Kristallstruktur eines Komplexes des IgG1-Fc-Fragments, mit der extrazellulären Domäne von Fc γ RIII beschrieben werden. In dem 1:1 Komplex von Rezeptor und Antikörper ist die D2-Domäne des Rezeptors zwischen den beiden C γ 2-Domänen des Fc-Fragments lokalisiert [20].

Vergleicht man aber die Komplexstruktur mit der vom freien Rezeptor und freien Ligand, stellt man fest, dass beide Moleküle sich für die Bindung einer sterischen Veränderung unterziehen müssen. Um mit dem Rezeptor interagieren zu können, muss die hinge-Region vom IgG eine stabile asymmetrische Konformation annehmen. Dadurch wird die Bindung eines zweiten Rezeptors verhindert. Alle anderen bisher untersuchten Fc γ Rs zeigen eine ähnliche Art der Interaktion mit IgG wobei die lower-hinge-Region eine Schlüsselrolle spielt und eine Bindungsstöchiometrie von 1:1 zustande kommt [16].

1.1.1.2 Fc ϵ RI

Mastzellen und Basophile exprimieren einen hoch affinen Rezeptor für IgE, Fc ϵ RI [21].

Fc ϵ RI bindet mit seiner D2-Domäne in der C ϵ 2-C ϵ 3 linker-Region von IgE. Die Bindung in dieser linker-Region, dem Äquivalent zur lower-hinge-Region im IgG, induziert auch hier eine strukturelle Asymmetrie.

Die gesamte Interaktion erinnert somit an den Fc γ RIII-IgG-Fc-Komplex. Die Bindungsstöchiometrie dieser Interaktion zeigt ebenfalls ein Verhältnis von 1:1 [16].

1.1.1.3 Fc α RI

Fc α RI (CD89) wird hauptsächlich auf myeloiden Zellen wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Neutrophilen, Eosinophilen und Kupffer Zellen exprimiert [12]. In Kombination mit der γ -Kette bildet Fc α RI einen bifunktionalen Signalrezeptor, welcher Zellen aktiviert sobald IgA-Antigen-Komplexe gebunden wurden. Er übt aber einen hemmenden Einfluss auf die Zellen aus, wenn IgA ohne gekoppeltes Antigen als Monomer gebunden wurde [22].

Seit Kurzem steht sowohl die Kristallstruktur von Fc α RI allein, als auch im Komplex mit IgA1 zur Verfügung [11]. Der extrazelluläre Teil von Fc α RI besteht aus zwei Ig-ähnlichen Domänen [5]. Nur die membrandistale Domäne kontaktiert IgA direkt, wobei aber immer zwei Fc α RI-Moleküle gleichzeitig ein IgA-Fc-Molekül binden. Diese 2:1 Stöchiometrie unterscheidet sich von der 1:1 Stöchiometrie von Fc γ RIII und Fc ϵ RI mit deren Liganden [16]. Anders als diese Rezeptoren, deren Gene sich auf Chromosom 1 befinden [23], wird der Fc α RI von einem Gen (FCAR) kodiert, welches im LRC auf Chromosom 19q13.4 liegt [3]. FCAR liegt demnach in der Nähe der KIR- und der NKp46-Gene [24]. Strukturelle und phylogenetische Analysen weisen auf eine nähere Verwandtschaft mit diesen Rezeptoren hin, als zu anderen FcRs [11, 25].

1.1.2 Hühner Fc-Rezeptoren

Bis heute konnten beim Huhn drei Rezeptoren, die IgY binden, beschrieben werden: FcRY, gallus gallus (gg) FcR und CHIR-AB1.

1.1.2.1 FcRY

Mit Hilfe dieses Rezeptors wird maternales IgY über die Dottersackmembran transportiert. Während der späten embryonalen Entwicklung gelangt IgY so in den embryonalen Blutstrom [26]. Die Hühner Dottersackmembranen besitzen eine IgY-Bindungsaktivität, die vergleichbar ist mit der Bindungsaktivität des neonatalen FcR (FcRn) der Säuger. Dieser kann IgG bei pH 6, jedoch nicht bei pH 8 binden [27-28]. Auch FcRY besitzt nur im sauren Milieu eine kompakte Struktur, die eine IgY-Bindungsstelle bildet. Im basischen Milieu ändert sich jedoch die Konformation des Rezeptors und die Bindungsstelle an IgY geht verloren.

Bei der Charakterisierung von FcRY konnte jedoch gezeigt werden, dass keine Verwandtschaft mit dem Säuger FcRn besteht. Stattdessen scheint FcRY das aviäre Homolog zum löslichen Phospholipase A₂ Rezeptor (PLA₂R) zu sein, welcher eine Aminosäuresequenzübereinstimmung von 55% aufweist. Wie dieser besitzt auch FcRY eine N-terminale cysteinreiche Ektodomäne (CysR), eine Fibronectin Type II-Wiederholung (FNII) und acht C-Typ Lektin-ähnliche Domänen [29].

1.1.2.2 GgFcR

Eine hohe Expression von ggFcR findet man auf Peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), Thrombozyten und Makrophagen.

Dieser Rezeptor besteht aus vier extrazellulären Ig-Domänen vom C2-Typ, gefolgt von einer transmembranen Region, welche Arginin als positiv geladene Aminosäure beinhaltet und von einem kurzen zytoplasmatischen Teil. GgFcR ist außerdem mit der γ -Kette assoziiert. Dies alles spricht dafür, dass es sich hierbei um einen potentiell aktivierenden Rezeptor handelt.

Phylogenetische Analysen zeigen eine Verwandtschaft mit Genen des LRC. Allerdings ist ggFcR selbst nicht im LRC kodiert, sondern liegt am Ende von Chromosom 20 [17].

1.1.2.3 CHIR-AB1

CHIR-AB1 wird auf B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert [8]. Die Kristallstruktur der CHIR-AB1-Ektodomäne konnte kürzlich beschrieben werden. Sie besteht aus einer C2-Typ Ig-Domäne, ähnlich der Ig-ähnlichen Domänen von humanen FcRs wie Fc γ Rs und Fc α RI. CHIR-AB1 kristallisiert jedoch, anders als diese Rezeptoren und andere monomere Mitglieder der IgSF, als ein zweifach symmetrisches Homodimer. In Lösungen kommt CHIR-AB1 als eine Mischung aus Monomeren und Dimeren vor. Die Rezeptor-Ligand-Bindungsstöchiometrie beträgt 2:1. 1:1-Komplexe dagegen zeigen eine wesentlich niedrigere Affinität [9].

1.2 Immunglobuline

Die einzelnen Ig-Klassen haben unterschiedliche Strukturen, biologische Aktivitäten und Verbreitung im Körper. Sie lösen durch die Interaktion ihres Fc-Fragments mit einem spezifischen Rezeptor letztlich verschiedene Effektormechanismen aus. Ihr

Grundbauplan jedoch ist gleich: sie bestehen jeweils aus zwei identischen schweren Ketten (H) und zwei identischen leichten Ketten (L) (Abbildung 1-2) [16].

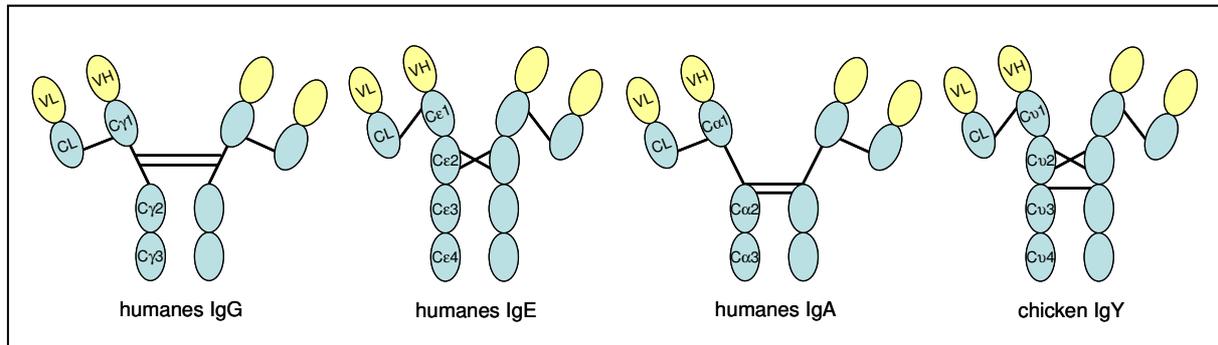


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der Immunglobuline.

Es existiert ein gemeinsamer Grundbauplan von je zwei leichten (L) und zwei schweren Ketten (H). Außerdem besteht jedes Immunglobulin aus einem konstanten (blau) und einem variablen (gelb) Anteil. Die Disulfidbrücken sind durch durchgezogene schwarze Linien zwischen den einzelnen Ketten gekennzeichnet.

1.2.1 humanes IgG

IgG ist der Hauptserumantikörper in allen Säugern. Er vermittelt die Opsonisierung von Antigenen, aktiviert das Komplementsystem und bietet nach dem Transport über die Plazenta Schutz für den Fetus [30].

Der konstante Teil der schweren Kette (CH) von IgG besteht nur aus drei Domänen [31]. Beim Vergleich der konstanten Region von IgG mit der von IgY konnte festgestellt werden, dass ein hoher Verwandtschaftsgrad zwischen C γ 2 und C γ 3 von IgG und C ν 3 und C ν 4 von IgY besteht. Allerdings existiert kein Äquivalent der C ν 2-Domäne im IgG. Stattdessen liegt zwischen der C γ 1- und der C γ 2-Domäne die genetisch kodierte hinge-Region. Sie stellt einen wichtigen Fortschritt dar indem sie unter anderem die Flexibilität von IgG erhöht [10].

1.2.2 humanes IgE

Wie aviäres IgY besteht auch das humane IgE aus vier CH-Domänen [31].

IgY beinhaltet ein Domänenpaar, C ν 2, das im Säuger-IgE konserviert ist als C ϵ 2, jedoch im IgG zur hinge-Region verkürzt wurde [30]. Die nahe Verwandtschaft zwischen aviärem IgY und dem humanen IgE zeigt sich auch in der Länge der Fc-Fragmente und der Verteilung der Cysteine in den CH1- und CH2-Domänen [31].

Damit ist auch die Anzahl und Organisation der Disulfidbrücken im IgE ähnlich derer im IgY [10].

Die Präsenz der C ϵ 2-Domäne reduziert die Dissoziationsrate von IgE von seinem Rezeptor um das 20fache, daher ergibt sich auch die hohe Affinität zwischen IgE und Fc ϵ RI [30].

1.2.3 humanes IgA

IgA ist der Hauptantikörper auf Schleimhautoberflächen [32].

IgA kommt nur bei Vögeln und Säugern vor, jedoch unterscheidet es sich dort jeweils in seiner Struktur. Während aviäres IgA aus vier CH-Domänen besteht, besitzt das humane IgA nur drei CH-Domänen und eine hinge-Region [33]. Genau wie beim IgG wird auch hier angenommen, dass die zweite Domäne verkürzt wurde um diese hinge-Region zu bilden [34]. Durch sie wird möglicherweise neben der Flexibilität auch die Stabilität des Moleküls erhöht [33].

1.2.4 Hühner IgY

Beim Huhn existieren drei Genfragmente für die schweren Ig-Ketten. Neben IgY kommen IgM und IgA vor. Während der sekundären Antikörperantwort kommt es zum Klassenwechsel von IgM zu IgY oder IgA [35].

Bei Amphibien, Reptilien und Vögeln ist IgY das funktionelle Äquivalent von Säuger IgG. Es wird angenommen, dass Säuger IgG, aber auch IgE, durch eine Verdopplung der Gene der schweren Ketten des IgY entstanden sind und IgY somit die Position eines Vorläufers einnimmt. Als solcher hat IgY wohl seine Eigenschaft als Hauptserumantikörper an IgG und die anaphylaktischen Eigenschaften an IgE weiter gegeben. Seine schwere Kette (ν -Kette) besteht aus einer variablen (VH) und vier CH-Domänen [10]. Die zusätzliche Domäne C ν 2, im Vergleich mit humanen IgG, hat jedoch beim IgY, anders als beim humanen IgE, nur einen kleinen Effekt auf die Assoziationsrate und keinen Einfluss auf die Dissoziationsrate vom Rezeptor [30].

Die Kristallstruktur des IgY-Fc-Fragments (Fc ν 3-4) zeigt, dass sich die C ν 4-Domänen der beiden schweren Ketten symmetrisch zueinander anordnen, während die C ν 3-Domänen eine gewisse Asymmetrie zueinander erkennen lassen. Bei einer Übereinanderlagerung dieser Ketten, mit den entsprechenden Fc-Fragmenten von IgG und IgE, konnte gezeigt werden, dass eine Kette von Fc ν 3-4 eine ähnliche

Quartärstruktur besitzt wie das IgG-Fc-Fragment, wohingegen die andere Kette dem IgE-Fc-Fragment in der Quartärstruktur ähnelt [36].

1.3 Vergleich der einzelnen Bindungsarten

Bei der Ig-FcR-Interaktion gibt es deutliche Unterschiede.

Die Bereiche an die die FcRs von IgG und IgE binden, sind sich sehr ähnlich. Sie liegen jeweils am N-terminalen Ende der vorletzten CH-Domäne. Diese Ähnlichkeit besteht auch von Seiten der Rezeptoren selbst, wobei die Igs je an der membranproximalen Domäne ihres spezifischen FcR gebunden werden. Weitere gemeinsame Merkmale der Interaktion, sind konservierte Aminosäurenreste sowie die gleiche Bindungstöchiometrie von 1:1 [16].

Die Fc α RI-Interaktionsstelle an IgA1 liegt dagegen im C-terminalen Bereich, an der Kopplungsstelle der C α 2- und C α 3-Domänen. Die beteiligten Aminosäuren verteilen sich demnach über zwei Domänen. Die IgA1-Bindungsstelle an Fc α RI liegt an der membrandistalen Domäne und die Bindungstöchiometrie liegt bei 2:1 [16].

Für CHIR-AB1 wurde bisher gezeigt, dass eine Bindung an das Fc-Fragment von IgY stattfindet [8]. Bei der Untersuchung der Bindungsaffinität von IgY an eine Monozytenzelllinie, konnte dessen Interaktionsstelle auf die Domänen C ν 3 und C ν 4 beschränkt werden [30].

1.4 Bedeutung der Zuckerreste

Zuckerreste können die Bindung der Igs an ihren Rezeptor beeinflussen. Für IgG und IgE sind konservierte Zuckerreste bekannt - Asn297 in der C γ 2-Domäne von IgG [37] und Asn394 in der C ϵ 3-Domäne von IgE [38]. Obwohl in den Kristallstrukturen keine direkten Kontaktstellen zwischen den Zuckerresten und den Rezeptoren gesehen werden konnten [38], üben sie einen indirekten Effekt auf die Interaktion aus. Eine Stabilisierung der Polypeptidkonformation durch Zucker kann nicht ausgeschlossen werden [39].

Eine Entfernung der Zuckerreste von Asn297 hat eine drastische Reduktion der Bindungsaffinität von IgG an den Fc γ RIII zur Folge. Für IgE konnte lediglich eine geringe Beeinflussung der Bindung, nach Entfernen der Zuckerreste von Asn394 gezeigt werden [37]. Das Vorkommen als auch das Fehlen bestimmter Zucker

Literaturübersicht

beeinflusst letztlich die gesamte Konformation der Oligosaccharide. Was auch im IgG zu einer Konformationsänderung der gesamten C γ 2-Domäne führt [16].

Auch in der homologen Domäne des IgY, C ν 3, existieren konservierte Zuckerreste (N407). Bei den Zuckerresten der einzelnen Igs handelt es sich aber um unterschiedliche Oligosaccharide. Wie im IgE können Hühner IgY-Fc-Fragmente auch nach der Entfernung der Zuckerreste noch an ihren Rezeptor binden [36].

2 Publikation

Chicken IgY Binds Its Receptor at the C_H3/C_H4 Interface Similarly as the Human IgA: Fc α RI Interaction¹

Jana Pürzel, Ramona Schmitt, Birgit C. Viertlboeck, and Thomas W. Göbel²

Chicken IgY, the ancestral form of mammalian IgE and IgG, is recognized by the high-affinity FcY receptor CHIR-AB1, a member of the leukocyte receptor family. In this study, we have characterized the receptor ligand interaction site by consecutive truncations of the Fc ν IgY domains and mutational analyses of selected residues. Using several fusion proteins that linked the human C γ 2 and C γ 3 domains with the Fc ν IgY domains, a binding assay revealed that both the Fc ν 3 and Fc ν 4 domains were essential for the IgY CHIR-AB1 interaction. Sequence comparisons of chicken IgY with human IgA demonstrated that 11 of the 19 contact residues important for the IgA Fc α RI interaction have been conserved in chicken IgY, although the overall amino acid identity is only 34%. Among the 19 amino acids at respective positions in IgY, the mutation of two residues in the Fc ν 3 and two in the Fc ν 4 domain completely abolished the IgY to CHIR-AB1 binding revealed by two independent assays. Three further mutations substantially altered the interaction. Molecular modeling on the C ν 3 to C ν 4 crystal structure revealed that all critical residues, although on two domains, are in close proximity. The importance of N-linked carbohydrates was demonstrated by the failure of the CHIR-AB1 interaction after mutation of the glycosylation site. The identification of the IgY C ν 3/C ν 4 interdomain region as critical for binding to CHIR-AB1 significantly enhances our understanding of the IgY receptor interaction and allows further conclusions regarding the FcR phylogeny. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 4554–4559.

Immunoglobulin Y is the major serum Ig of amphibians, reptiles, and birds (1). It is believed that mammalian IgE and IgG were generated by the duplication of IgY genes (2). Avian IgY combines structural and functional features of both mammalian isotypes. The IgY H-chain is composed of one variable domain and four constant region domains, with the inferred intrachain disulfides as in IgE (2). IgY can also induce anaphylactic reactions and degranulation of basophils (2). On the other hand, its amount and tissue distribution as well as the maternal transfer of IgY into the egg yolk are typical IgG-like characteristics. Because mammalian IgG contains only three C_H domains, it has been speculated that the C α 2 domain has been either successively condensed or changed by alternative splicing to form a hinge region (3). The division of IgY into two Ab isotypes may have been beneficial for separating the biological functions of IgE and IgG. Similarly as IgY, avian IgA also contains four C α domains and no hinge region (4). It therefore is likely that selection has favored shorter Ig with a flexible hinge region (5).

Three receptors that interact with chicken IgY have been described to date. An orthologue of the mammalian phospholipase A₂ receptor present in the chicken yolk sac is responsible for the transfer of IgY to yolk (6). We have recently identified a second receptor, *Gallus gallus* FcR, with four extracellular Ig domains on chicken chromosome 20, a region that contains no FcR in mammals (7). A third receptor, a member of the chicken Ig-like recep-

tor (CHIR)³ family designated CHIR-AB1, is encoded by the chicken leukocyte receptor cluster (8, 9). It has only a single Ig domain, binds IgY with high affinity, and has features of activating as well as inhibitory Ig-like receptors (9). The entire CHIR family has been vastly expanded with >100 receptors (10, 11). In an individual chicken, up to 18 CHIR-AB1 homologues could be isolated, including several versions that bound IgY with different affinities (12). Sequence comparisons of these different CHIR-AB1 homologues together with site-directed mutagenesis studies allowed us to define the putative IgY binding site on CHIR-AB1. Further analysis of the CHIR-AB1 to IgY interaction revealed a 2:1 receptor ligand binding stoichiometry and demonstrated that CHIR-AB1 exists as a mixture of monomers and dimers (13). The present study was initiated to examine the interaction of IgY and CHIR-AB1. In particular, we wanted to determine the C ν domains and the contact residues responsible for the CHIR-AB1 interaction.

Materials and Methods

Cloning procedures, mutagenesis, data analysis

All constructs (see Fig. 1A) were prepared by PCR using chimeric primers (Table I) and linking PCR as previously described (14). As templates, plasmids containing human IgG1 C γ 2 to C γ 3 and chicken IgY Fc ν 1 to Fc ν 4 were used. IgY was initially cloned by PCR according to the published sequence (3) and the standard numbering of IgY was used (15). Cys²³² of Fc ν 2 and Cys³⁴⁷ of Fc ν 3 were mutated to Ala and Ser, respectively, to prevent additional disulfide bonds (15). In the first PCR, the selected regions were individually amplified with primers that contained overlapping sequences. After gel purification with the DNA isolation spin kit (AppliChem), both purified DNA fragments were then annealed and reamplified with outside primers. The resulting products were cloned using the pSecTag/FRT/V5-His TOPO kit (Invitrogen). Transformed bacterial colonies (Top10 *Escherichia coli*) were tested by PCR for correct orientation, and plasmids were prepared (NucleoSpin plasmid kit; Machery-Nagel). All amplifications were performed with the proofreading Herculase enhanced DNA polymerase (Agilent).

Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Munich, Germany

Received for publication May 29, 2009. Accepted for publication July 24, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant 489/3-6 (to T.W.G.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Thomas Göbel, Dept. of Veterinary Sciences, Institute for Animal Physiology, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany. E-mail address: goebel@lmu.de

³ Abbreviations used in this paper: CHIR, chicken Ig-like receptor; LRC, leukocyte receptor complex.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

Table I. Summary of oligonucleotides used for linking PCR and mutations

Name ^a	Sequence ^b	Specificity
1290s	CTGTCTCCGGTAAAG TCGCCCGGGTAGAT	Fcγ3 + Fcμ2
1291as	ATCTACCCGGCGACTTT TACCCGGAGACAG	Fcγ3 + Fcμ2
1292s	CTGTCTCCGGTAAAG GACGGCGCTCAGAGCTCCAGCC	Fcγ3 + Fcμ3
1293as	GGCTGGAGCTCTGAGCGCGTCTTT TACCCGGAGACAG	Fcγ3 + Fcμ3
1294s	CTGTCTCCGGTAAAG GGACCCACCACCCCA	Fcγ3 + Fcμ4
1295as	TGGGGTGGTGGGTCC TTTACCCGGAGACAG	Fcγ3 + Fcμ4
1313s	CCCGGGCGAG GGC TACATCAGC	L362A
1315s	GGCGGAGT GGC ATCAGCTTAGACG	Y363A
1335s	CCCGGGCGAGCTGTAC GGC AGCTTAGACGCC	I364A
1379s	CCACCCACCT CGG ATCTACCCCTTCGGC	L457R
1357s	CGTGACATCGAGAT CGGT GGCTCCGCGACCACC	R490A
1359s	CGAGATCCGGTGG GCC CGCACCACCGC	L492A
1381s	GTGGCTCCGCGAC CGC CGCGCGTTC	H495R
1383s	CGCGACCACCG CGC GTTCGCCACC	A497R
1361s	GGTGTTCGCC TGCG CGCGGTGCACGAGG	M547A
1363s	GCCTGCATGGCGGT GGC GAGGCGCTGCCCATGCG	H550A
1365s	GCATGGCGGTGCAC CGCG CGCTGCCCATGCG	E551A
1367s	GGCGGTGCACGAG CGG CTGCCCATGCG	A552R
1369s	CGGTGCACGAGGCG CGC CCATGCGCTTCAGCC	L553A
1317s	GCACGAGGCGCT GGC ATGCGCTTCAGCC	P554A
1387s	GAGGCGCTGCC AGG CGCTTCAGCCAG	M555R
1341s	GGCGCTGCCAT GGC TTTCAGCCAGCGCACG	R556A
1319s	GGCGTGCCTATGCG CGC AGCCAGCGCACGC	F557A
1391s	CCCATGCGCT TAGG CAGCGCACGCTGC	S558R
1371s	CCCATGCGCTTCAG CGC CGCACGCTGCAGAAAC	Q559A
1343s	CCTCAAGAACA CTTC GCCGGCACCTACAGCGCC	N407A

^aThe suffixes "s" and "as" indicate sense and antisense orientation, respectively. For mutation primers only sense primers are shown; antisense primers are identical in reverse orientation.

^bBold letters indicate overlapping primer regions or positions of mutations.

For mutagenesis, internal mismatch primers and their complements were used to incorporate the substitutions. Each pair of primers consisted of 25- 45 base pairs (Table I). Using the plasmid containing the human IgG1 Cγ2 to Cγ3 domains linked to the chicken IgY Fcμ3 to Fcμ4 domains as templates, PCR was performed in 22 cycles followed by *DpnI* digestion to digest the original plasmid and transformation of bacteria. All constructs were sequenced before use (GATC). The sequences were analyzed using the Lasergene software package (GATC Biotech) and molecular modeling was performed with Swiss-PdbViewer DeepView version 4.0 (www.expasy.org/spdbv/) (16).

Expression and analyses of recombinant proteins

The constructs were transiently transfected into 4.3×10^5 293T human embryonic kidney cells (17) per well of a 24-well tissue culture plate (Nunc) using the Metafectene liposomal transfection reagent according to the manufacturer's procedure (Biontech Laboratories). Following 48 h of culture in RPMI 1640 containing 10% low IgG FCS, 1% penicillin/streptomycin (all from Invitrogen), the supernatant was removed, centrifuged, and stored at 4°C.

To check for expression, an ELISA was performed as previously described (12). Briefly, an ELISA plate (MaxiSorp polystyrene 96-well plate; Nunc) was coated with goat anti-human IgG Ab (Southern Biotechnology Associates), blocked with PBS containing 0.05% Tween 20 and 5% nonfat dried milk powder (all from AppliChem), and incubated with the fusion proteins. Detection was performed with a goat anti-human IgG HRP conjugate (Southern Biotechnology Associates) and tetramethylbenzidine (AppliChem). Western blotting following SDS-PAGE separation was performed with anti-human IgG HRP diluted 1/8,000 PBS containing 0.05% Tween 20.

BWZ.36 reporter assay and staining of transfected cell line

The reporter assay was essentially performed as described previously (9) but adapted to a 96-well format. Briefly, 96-well tissue culture dishes were coated overnight with goat anti-human IgG at 4°C followed by incubation with the different fusion proteins in equalized concentrations for 4 h at 37°C. Finally, BWZ.36 mouse thymocyte cells that stably expressed a CHIR-AB1-CD3ζ fusion protein (9) were incubated for 18 h at 37°C on the dishes. Then, the cells were lysed and β-galactosidase was detected with a high-sensitivity β-galactosidase assay kit (Agilent) after an incubation period of 18 h in a 37°C incubator.

The 2D8-CHIR-AB1 cells, resembling a chicken B cell line (18) stably transfected with CHIR-AB1 as described (9), were reacted with the different fusion proteins as indicated for 30 min on ice, followed by two washing steps and detection with a donkey anti-human Ig DyLight 488 conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories) before analysis with a FACScan flow cytometer (BD Biosciences). For the determination of a cutoff value, control 2D8 cells not expressing CHIR-AB1 were stained.

Results

The Fc binding site is located within the Fcμ3 and Fcμ4 domains

In previous experiments we could already show that the binding site of IgY to CHIR-AB1 is located within the C-terminal domains, especially because a papain-digested Fc version of IgY still reacted with CHIR-AB1 (9). To further narrow the binding site down to a specific domain, we generated several recombinant human Fc-Fcμ fusion proteins with progressive domain truncations from the N terminus (Fig. 1A). The concentrations of all recombinant proteins were adjusted using an ELISA, and their integrity was controlled by Western blotting (data not shown). As long as the Fcμ3 and Fcμ4 domains were present in the constructs, strong binding comparable to complete IgY could be observed using the BWZ.36 reporter assay (Fig. 1B). In contrast, the Fcμ3 or Fcμ4 domain alone did not bind to CHIR-AB1. These results suggest an interaction site on IgY that is created by both the Fcμ3 and Fcμ4 domains.

Several residues critical for the FcαRI:human IgA interaction are conserved in IgY

The putative location of the CHIR-AB1 binding site within the two C-terminal domains is reminiscent of the situation that is found between human IgA-1 and its receptor, FcαRI, where two regions of the two C-terminal domains Cα2 and Cα3 are involved in receptor interaction (19, 20). In contrast, the IgG site for FcR binding is located close to the hinge region. As a next step in identifying

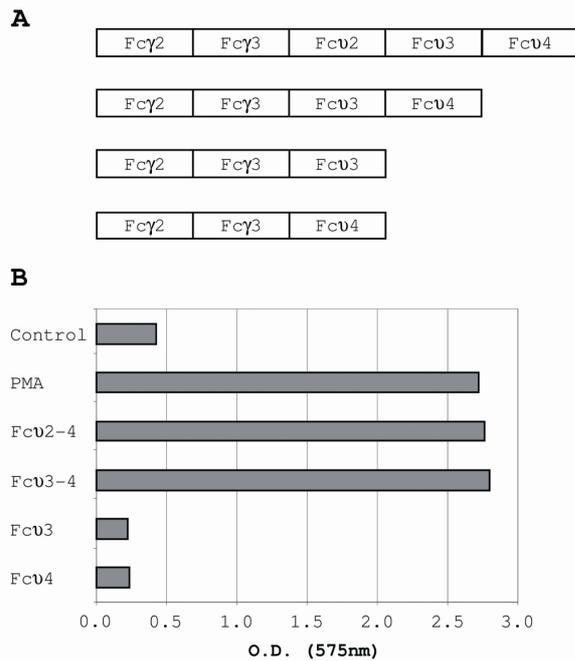


FIGURE 1. CHIR-AB1 binding site is located with the Fcν3 and Fcν4 domains. *A*, Schematic representation of the fusion protein constructs. *B*, Plates were coated with anti-human Ig and the respective fusion protein before the addition of BWZ.36 CHIR-AB1 reporter cells. β-Galactosidase activity was determined after 18 h of culture. Values obtained for the negative control (cells stimulated with unrelated Fc fusion protein; indicated as “Control”) and positive control (cells stimulated with PMA and calcium ionophore; indicated as “PMA”) are indicated. One representative of five experiments is shown.

critical IgY residues involved in CHIR-AB1 binding, we aligned the sequences of the last two C_H domains of chicken IgY, human IgA-1, duck IgY, and chicken IgA (Fig. 2). The amino acid identity between the two C-terminal domains of chicken IgY and human IgA was only 34%. In human IgA, three residues in the Cα2 and 16 residues in the Cα3 domain are known to be involved in the FcαRI interaction (Fig. 2, boxed regions) (19, 20). A total of 11

out of these 19 residues (one in Fcν3 and 10 in Fcν4) were found to be conserved in the respective chicken IgY domains. Similarly, the duck IgY still contained 10 of the 19 residues. Chicken IgA as direct homologue to human IgA had a slightly higher overall amino acid identity (42%); however, only six of the 19 residues were conserved. These alignments highlight the regions involved in the IgA:FcαRI interaction that may be also important for IgY binding to CHIR-AB1.

Mutational analysis identifies critical IgY residues involved in CHIR-AB1 interaction

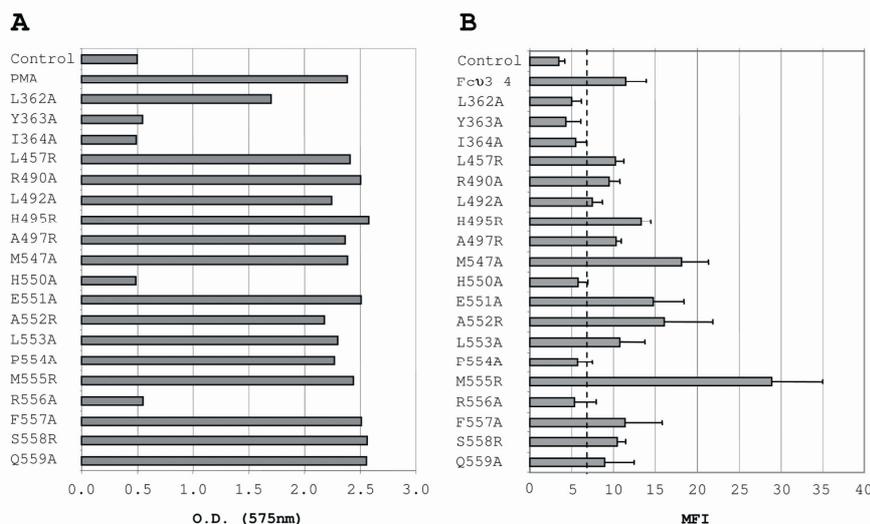
The IgY residues located at identical positions as the 19 human IgA contact residues were mutated (Fig. 3). All mutations were performed on the Fcν3 or Fcν4 domain construct, because the respective fusion proteins bound as strong to CHIR-AB1 as full-length IgY (data not shown). In general, all residues were mutated to alanine and, in the case of a wild-type alanine, at the position it was mutated to arginine. In four instances (L457, H495, M555, and S558), the mutation to alanine resulted in poor expression and therefore these residues were also mutated to arginine. After the mutations were verified by sequencing, the expression levels were equalized by ELISA. The mutated Fv fusion proteins were subjected to two independent assays to test their CHIR-AB1 binding capacity. In the BWZ.36 assay they were coated onto plates and their ability to induce β-galactosidase upon binding to BWZ.36 reporter cells stably expressing CHIR-AB1 was measured (Fig. 3A). A total of four mutations totally abolished IgY binding in this assay (Fig. 3A and Table II). These included two Fcν3 mutations (Y363A and I364A) at identical positions to the “LLL” motif of the Fcα2 domain and two Fcν4 mutations (H550A and R556A) on the C-terminal domain that contained the PLAF motif in the human IgA-1 sequence known to be essential for receptor binding.

In addition, the soluble Fv fusion proteins were used for staining 2D8-CHIR-AB1 cells (Fig. 3B). The results obtained in this assay generally reflected those of the BWZ.36 assay; however, they were more variable and the assay seemed to be of slightly lower sensitivity. An arbitrary threshold was used to distinguish positive from negative staining reaction (Fig. 3, dashed line). The effect of the four critical mutations characterized in the BWZ.36 assay was confirmed by the inability of these fusion proteins to stain 2D8-CHIR-AB1 cells. At two additional positions (L362A and P554A) the staining was below the threshold and interestingly, at least in the



FIGURE 2. Alignment of IgY and IgA identifies conserved residues. Alignment of the penultimate (*upper panel*) and ultimate (*lower panel*) Fc domains of chicken IgY (gg Cν3 and Cν4), human IgA-1 (hu Cα2 and Cα3), duck IgY (du Cν3 and Cν4), and chicken IgA (gg Cα3 and Cα4). Periods represent residues identical to chicken IgY. Positions in IgA-1 that contact FcαRI are boxed. The approximate position of β-strands is given above the sequence. Conserved cysteine residues forming intrachain bonds are marked by an asterisk; filled arrow heads identify residues critical for binding to CHIR-AB1. GenBank accession numbers: human IgA-1, AAC82528; chicken IgY, S00390; duck IgY, B46524; chicken IgA, AAB22614.

FIGURE 3. Mutational analysis reveals residues essential for IgY:CHIR-AB1 interaction. Selected amino acids in the Fc ν 3 and Fc ν 4 domains were mutated and expressed as fusion proteins. *A*, Binding of the mutated Fc-IgY fusion proteins to CHIR-AB1 was analyzed using BWZ.36-CHIR-AB1 cells. One representative of five experiments is shown. *B*, Staining of 2D8-CHIR-AB1 cells with the Fc-IgY fusion proteins. The mean fluorescence intensity (MFI) is shown for three independent experiments (mean \pm SD). Dashed line indicates cutoff value for positive reaction set by staining control 2D8 cells not expressing CHIR-AB1.



case of L362A, the BWZ.36 assay was also slightly diminished as compared with the other results. Finally, one mutation (M555R) consistently showed increased staining activity of transfected cells. These results suggest that the mutation of some residues completely abolishes IgY binding to CHIR-AB1, whereas others have a marginal effect on the interaction.

Recently, a crystal structure of the Fc ν 3 or Fc ν 4 domains became available (21). We used this structure to pinpoint the position of the seven residues affecting CHIR-AB1 binding. Although they are located on two different domains, all of them cluster in a small region in the three-dimensional structure (Fig. 4). Interestingly, the four residues that totally abolished CHIR-AB1 binding were found to be in close proximity (Fig. 4, colored in red) whereas the other residues were located at the outside borders (Fig. 4, colored in purple), thus emphasizing that these residues may indirectly affect CHIR-AB1 binding. In conclusion, mutagenesis of selected IgY residues identified six residues located in the Fc ν 3 or Fc ν 4 domains that are important for the interaction to CHIR-AB1.

Table II. Effects of IgY mutations on CHIR-AB1 binding^a

Residue in Human IgA-1	Mutation in IgY	BWZ.36 Result	Staining Result of 2D8 CHIR-AB1 Cells
L256	L362A	+/-	-
L257	Y363A	-	-
L258	I364A	-	-
E348	L457R	+	+
R382	R490A	+	+
L384	L492A	+	+
S387	H495R	+	+
E389	A497R	+	+
M433	M547A	+	+
H436	H550A	-	-
E437	E551A	+	+
A438	A552R	+	+
L439	L553A	+	+
P440	P554A	+	-
L441	M555R	+	++
A442	R556A	-	-
F443	F557A	+	+
T444	S558R	+	+
Q445	Q559A	+	+

^a Conserved residues between human IgA1 and IgY are set in bold.

The lack of N-glycosylation hinders the IgY:CHIR-AB1 interaction

It has been demonstrated by enzymatic digestion and site-directed mutagenesis that the removal of carbohydrates from IgG results in loss of FcR binding, whereas the effect was less pronounced for IgE (22, 23). The glycosylation site found on the Fc ν 3 domain (N407) has been conserved in both the mammalian C γ 2 and the C ϵ 3 domain, respectively. To gain insight into whether N-linked

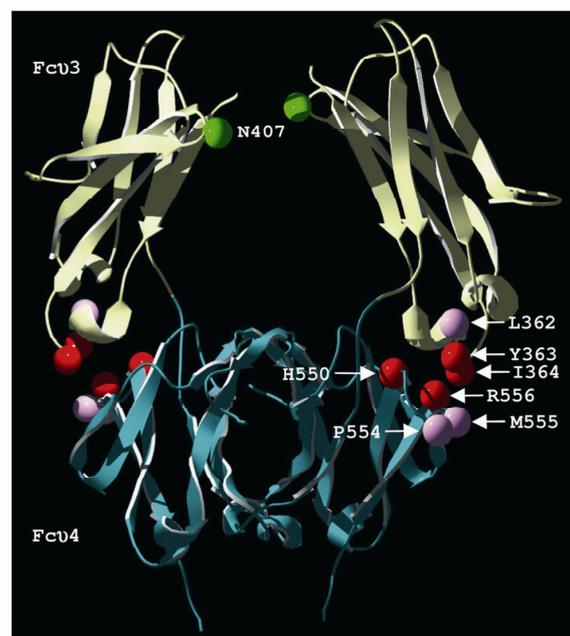


FIGURE 4. Localization of residues involved in IgY:CHIR-AB1 interaction. The Protein Data Bank identifier 2w59 was used to model the positions essential for IgY-CHIR-AB1 interaction. The residues involved in the CHIR-AB1 interaction are shown as space filling and are color coded as follows: red, totally abrogating; purple, marginally affecting; green, N407 glycosylation site. The Fc ν 3 and Fc ν 4 domains of chain A and B are colored yellow and blue, respectively.

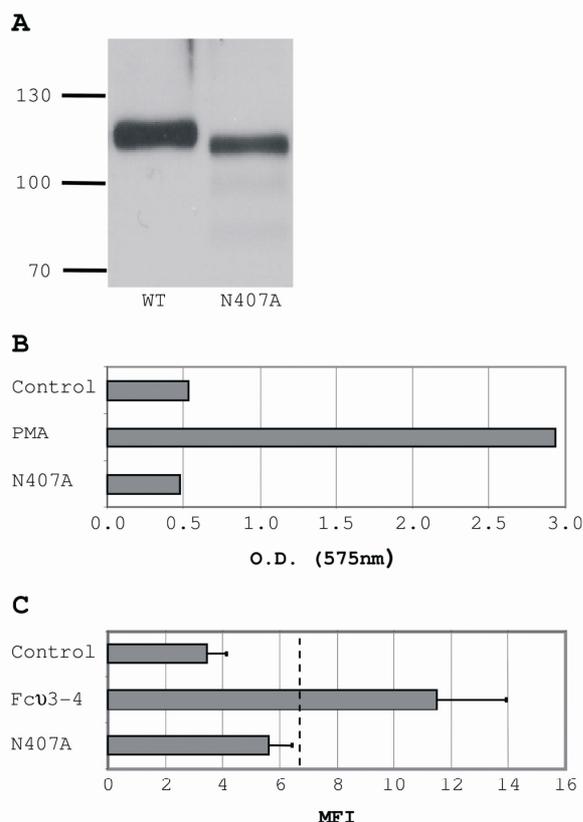


FIGURE 5. Lack of *N*-linked carbohydrates on the Fc γ 3 domain prevents interaction with CHIR-AB1. *A*, Unmutated (WT, wild type) Fc γ 3/Fc γ 4 fusion protein and the N407A IgY mutant were run on using SDS-PAGE under nonreducing conditions, blotted, and reacted with anti human Ig- peroxidase. Migration of the markers is given on the left. *B*, Plate-bound N407A did not elicit β -galactosidase production in BWZ.36-CHIR-AB1; controls are similar to those in Fig. 1. *C*, Staining of 2D8-CHIR-AB1 cells with the N407A IgY mutant. Controls are as in Fig. 3*B*.

glycosylation of the Fc γ 3 domain is important for the interaction with CHIR-AB1, we mutated this residue to alanine. The effect of the mutation could be observed by the reduced m.w. after Western blotting as compared with the wild-type Fc γ 3-Fc γ 4 fusion protein (Fig. 5*A*). The N407A mutation totally abolished the binding of IgY to CHIR-AB1 in the BWZ.36 assay, thus reflecting a situation similar to that of IgG (Fig. 5*B*). In addition, the N407A mutated protein did not bind to the 2D8-CHIR-AB1 cells as revealed by flow cytometry (Fig. 5*C*).

Discussion

IgY has been described as an ancestor of mammalian IgG and IgE (2). On first sight it would have therefore been consequent that the binding of IgY to its receptor closely resembles that of IgG or IgE to their Fc receptors. In contrast, the results presented here clearly demonstrate that the IgY CHIR-AB1 interaction is similar to that of mammalian IgA to Fc α RI.

Truncation analyses gave the first hints that the IgY binding site to CHIR-AB1 is located in the two C-terminal domains. When compared with the similar region of human IgA-1, it is striking that many of the IgA contact residues have been conserved, as has already been noted (21). Consequently, our mutational analysis focused on those residues in IgY that resembled the contact resi-

dues of IgA to Fc α RI and included 11 conserved amino acids. Two critical areas in IgY that overlap with the interdomain loops of C α 2 (L256 to L258) and C α 3 (P440 to F443) were defined, whereas the mutations of the other C α 4 residues with the exception of H550 did not affect CHIR-AB1 binding. We employed two distinct assays for testing the IgY binding to CHIR-AB1. Although both assays gave essentially similar results, BWZ.36 produced a clear positive vs negative result whereas the staining assay was more variable, suggesting that the latter assay may be less sensitive but still very informative. By comparing the results of both assays, it was possible to define two residues that, when mutated, decreased instead of fully abolishing CHIR-AB1 binding. This may indicate that these residues do not directly bind to CHIR-AB1 but influence the binding site indirectly. The position of these residues in the three-dimensional structure supports this conclusion, because they are located at the outside borders of the binding residues. A further mutation (M555R) was unique in its ability to consistently increase the staining of 2D8-CHIR-AB1 cells as compared with the positive control. It is likely that the M555R mutation directly affects the accessibility of the binding residues, potentially by altering the hydrogen bonds and thus leading to an increased IgY CHIR-AB1 interaction.

Taylor et al. (21) recently reported that either enzymatic or mutational deglycosylation of IgY does not affect the binding to the MQ-NCSU chicken monocyte cell line. In contrast, the N407A mutation abolished the CHIR-AB1 binding in both assays. Because the molecular identity of the Fc γ receptor on MQ-NCSU cells has not been defined (15), it is likely that this cell line expresses another receptor different from CHIR-AB1 that is insensitive to the deglycosylation of IgY. In this regard it is important to note that we have described a large set of CHIR-AB1 homologues present in the chicken leukocyte receptor complex (LRC) (12). It may well be that the CHIR-AB homologues not only differ in their affinity to IgY, but also in their fine specificity, and that differential glycosylation of IgY may fine-tune the specificity to certain CHIR-AB receptors.

The characterization of the CHIR-AB1 binding site on IgY within the C α 3/C α 4 interdomain surface is also plausible regarding two further observations. Firstly, the CHIR-AB1 is located within the chicken LRC. This locus contains the Fc α RI in those mammals where it has not been deleted (24); in addition, it harbors the bovine Fc γ 2R, a receptor specific for bovine IgG2 (25). All of these receptors share the respective binding site to Ig. Secondly, the respective areas in mammalian IgG and IgA have been defined as regions that are particularly suited for protein interactions due to their highly accessible and hydrophobic nature (26), creating binding sites for proteins such as protein A, protein G, and rheumatoid factors (27). Moreover, this site in IgA is also recognized by several bacterial decoy proteins such as the streptococcal SIR22 and SSL proteins of *Staphylococcus aureus* (28, 29). This may imply that similar bacterial decoy proteins bind to IgY and thus disturb the interaction of IgY with its receptor, although to our knowledge at the present time there is no report regarding such a mechanism, and protein A or G do not interact with IgY. In mammals, this interaction of bacterial proteins with IgA that hinders its binding to Fc α RI is thought to have caused mutations in IgA and ultimately the deletion of Fc α RI in some species (24, 30). It is tempting to speculate that similar mechanisms occurred in bird IgY. Ducks display two forms of IgY, one of which is truncated after the C α 2 domain. This form may have evolved due to the pressure of bacterial proteins interfering with the binding site for the FcR and, likewise in chickens, we have recently characterized many different CHIR-AB homologues (12) that may have evolved under similar conditions.

The crystallization of CHIR-AB1 revealed that it differs from mammalian FcRs in its ability to form homodimers that seem to be in a monomer:dimer equilibrium rather than forming obligate dimers (13). Taking this fact together with the stoichiometry of two CHIR-AB1 molecules binding to a single IgY and the interaction site at the C α 3/C α 4 interphase leads to the conclusion that CHIR-AB1 may be present as a homodimer on the cell surface in an unbound form. Upon binding to IgY, the dimerization could be disrupted in such a way that two monomers interact with the IgY molecule. This “dimer disruption” would have consequences for the signal transduction of the CHIR-AB1 molecule. This hypothesis will be testable in future experiments.

The findings in this report also allow conclusions to be drawn regarding the FcR evolution. The LRC on human chromosome 19 may have been the first location of FcR genes. The remains in mammals are the Fc α RI and the bovine Fc γ R2 (25). In man, the FcR genes are located in a cluster on chromosome 1. During this transition from chromosome 19 to chromosome 1 several features of the FcR have been modified, including the shift of the binding site toward the hinge region and a change in stoichiometry from 2:1 for the IgA:Fc α RI interaction to 1:1 for the IgG or IgE interaction to its FcR. Moreover, a massive expansion took place on chromosome 1, yielding an array of different affinity FcR with distinct tissue distributions and functional capabilities (31). This expansion may have also caused the generation of FcR-like molecules that share high homology to FcR but do not interact with Ig (32). Support for this hypothesis is the finding of a single chicken FcR-like molecule on the syntenic region of the FcR on chromosome 25 (33). Human chromosome 1 also harbors the poly-Ig receptor and, in its vicinity, the Fc α μ receptor. The chicken poly-Ig receptor shares homology with the Fc α μ R and is located on chromosome 26 (T. W. Göbel, unpublished observation). Interestingly, the interaction site of IgA and IgM with the Fc α μ receptor is confined to the interdomain regions (34) defined for CHIR-AB1 and Fc α RI, again arguing that these receptors have a common origin. In fact, the Fc α μ receptor has several features in common with CHIR-AB1, including its single Ig domain, its expression on B lymphocytes, and its high-affinity binding that may be important for rapid receptor recycling to maintain constant plasma levels (35).

In conclusion, the revealed Fc α 3/Fc α 4 interaction with CHIR-AB1 allows drawing conclusions for the FcR phylogeny where a primordial locus within the LRC has been dispersed to other chromosomal areas with consequences such as shift in the Ig binding site, novel receptor to ligand interaction, and different functional capabilities.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Litman, G. W., M. K. Anderson, and J. P. Rast. 1999. Evolution of antigen binding receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 109–147.
- Warr, G. W., K. E. Magor, and D. A. Higgins. 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 16: 392–398.
- Parvari, R., A. Avivi, F. Lentner, E. Ziv, S. Tel-Or, Y. Burstein, and I. Schechter. 1988. Chicken immunoglobulin γ -heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.* 7: 739–744.
- Mansikka, A. 1992. Chicken IgA H chains: implications concerning the evolution of H chain genes. *J. Immunol.* 149: 855–861.
- Belov, K., and L. Hellman. 2003. Immunoglobulin genetics of *Ornithorhynchus anatinus* (platypus) and *Tachyglossus aculeatus* (short-beaked echidna). *Comp. Biochem. Physiol. A* 136: 811–819.
- West, A. P., Jr., A. B. Herr, and P. J. Bjorkman. 2004. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. *Immunity* 20: 601–610.
- Viertlboeck, B. C., R. Schmitt, M. A. Hanczaruk, R. P. Crooijmans, M. A. Groenen, and T. W. Göbel. 2009. A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters. *J. Immunol.* 182: 1533–1540.
- Viertlboeck, B. C., F. A. Habermann, R. Schmitt, M. A. Groenen, L. Du Pasquier, and T. W. Göbel. 2005. The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *J. Immunol.* 175: 385–393.
- Viertlboeck, B. C., S. Schweinsberg, M. A. Hanczaruk, R. Schmitt, L. Du Pasquier, F. W. Herberg, and T. W. Göbel. 2007. The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 11718–11723.
- Rogers, S. L., B. C. Viertlboeck, T. W. Göbel, and J. Kaufman. 2008. Avian NK activities, cells and receptors. *Semin. Immunol.* 20: 353–360.
- Viertlboeck, B. C., R. P. Crooijmans, M. A. Groenen, and T. W. Göbel. 2004. Chicken Ig-like receptor B2, a member of a multigene family, is mainly expressed on B lymphocytes, recruits both Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and inhibits proliferation. *J. Immunol.* 173: 7385–7393.
- Viertlboeck, B. C., S. Schweinsberg, R. Schmitt, F. W. Herberg, and T. W. Göbel. 2009. The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors. *J. Immunol.* 182: 6985–6992.
- Arnon, T. I., J. T. Kaiser, A. P. West, Jr., R. Olson, R. Diskin, B. C. Viertlboeck, T. W. Göbel, and P. J. Bjorkman. 2008. The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 381: 1012–1024.
- Viertlboeck, B. C., A. Wortmann, R. Schmitt, J. Plachy, and T. W. Göbel. 2008. Chicken C-type lectin-like receptor B-NK, expressed on NK and T cell subsets, binds to a ligand on activated splenocytes. *Mol. Immunol.* 45: 1398–1404.
- Taylor, A. I., H. J. Gould, B. J. Sutton, and R. A. Calvert. 2008. Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure. *J. Biol. Chem.* 283: 16384–16390.
- Guex, N., and M. C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18: 2714–2723.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7: 379–387.
- Puchler, F., T. Göbel, U. Breyer, A. Ohnemus, P. Stacheli, and B. Kaspers. 2003. A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon- γ . *J. Immunol. Methods* 274: 229–232.
- Herr, A. B., E. R. Ballister, and P. J. Bjorkman. 2003. Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc α RI and its complex with IgA1-Fc. *Nature* 423: 614–620.
- Wines, B. D., C. T. Sardjono, H. H. Trist, C. S. Lay, and P. M. Hogarth. 2001. The interaction of Fc α RI with IgA and its implications for ligand binding by immunoreceptors of the leukocyte receptor cluster. *J. Immunol.* 166: 1781–1789.
- Taylor, A. I., S. M. Fabiane, B. J. Sutton, and R. A. Calvert. 2009. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry* 48: 558–562.
- Radaev, S., and P. D. Sun. 2001. Recognition of IgG by Fc γ receptor: the role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J. Biol. Chem.* 276: 16478–16783.
- Hunt, J., R. L. Beavil, R. A. Calvert, H. J. Gould, B. J. Sutton, and A. J. Beavil. 2005. Disulfide linkage controls the affinity and stoichiometry of IgE Fc ϵ 3-4 binding to Fc ϵ RI. *J. Biol. Chem.* 280: 16808–16814.
- Parham, P. 2008. The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. *Semin. Immunol.* 20: 311–316.
- Morton, H. C., C. J. Howard, A. K. Storset, and P. Brandtzaeg. 2001. Identification of residues within the extracellular domain 1 of bovine Fc γ 2R essential for binding bovine IgG2. *J. Biol. Chem.* 276: 47794–47800.
- DeLano, W. L., M. H. Ultsch, A. M. de Vos, and J. A. Wells. 2000. Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* 287: 1279–1283.
- Woof, J. M., and D. R. Burton. 2004. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 89–99.
- Pleass, R. J., T. Areschoug, G. Lindahl, and J. M. Woof. 2001. Streptococcal IgA-binding proteins bind in the Ca2-Ca3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89. *J. Biol. Chem.* 276: 8197–8204.
- Langley, R., B. Wines, N. Willoughby, I. Basu, T. Proft, and J. D. Fraser. 2005. The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc α RI binding and serum killing of bacteria. *J. Immunol.* 174: 2926–2933.
- Abi-Rached, L., K. Dorighi, P. J. Norman, M. Yawata, and P. Parham. 2007. Episodes of natural selection shaped the interactions of IgA-Fc with Fc α RI and bacterial decoy proteins. *J. Immunol.* 178: 7943–7954.
- Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2008. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 34–47.
- Davis, R. S. 2007. Fc receptor-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 25: 525–560.
- Taylor, A. I., H. J. Gould, B. J. Sutton, and R. A. Calvert. 2007. The first avian Ig-like Fc receptor family member combines features of mammalian FcR and FCRL. *Immunogenetics* 59: 323–328.
- Ghumra, A., J. Shi, R. S. McIntosh, I. B. Rasmussen, R. Braathen, F. E. Johansen, I. Sandlie, P. K. Mongini, T. Areschoug, G. Lindahl, et al. 2009. Structural requirements for the interaction of human IgM and IgA with the human Fc α μ receptor. *Eur. J. Immunol.* 39: 1147–1156.
- Kikuno, K., D. W. Kang, K. Tahara, I. Torii, H. M. Kubagawa, K. J. Ho, L. Baudino, N. Nishizaki, A. Shibuya, and H. Kubagawa. 2007. Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fc α μ receptor. *Eur. J. Immunol.* 37: 3540–3550.

3 Diskussion

Für die Klassen Amphibien, Reptilien, Vögel und die Unterklasse der Lungenfische, konnte ein Vorkommen von IgY gezeigt werden. Außerdem kann angenommen werden, dass IgY auch in vielen bereits ausgestorbenen Wirbeltieren vorkam. Allerdings wurde es bisher nur bei einer geringen Anzahl von Spezies charakterisiert. Es konnte jedoch bereits eindeutig festgestellt werden, dass IgY ein Vorfahre von IgG und IgE ist [10]. Auf Grund dieser Verwandtschaft hätte man eine ähnliche Art der Interaktion zwischen IgY und CHIR-AB1, einem im LRC kodierten hoch affinen IgY-FcR erwartet, nämlich mit einer Interaktionsstelle im N-terminalen Bereich. Wie in der vorliegenden Arbeit aufgeführt, war dies jedoch nicht der Fall. Auch Fragen bezüglich des Zusammenhanges zwischen Struktur und Funktion blieben bisher offen. Während IgG als Hauptserumantikörper im Säuger, ebenso eine wichtige Rolle spielt wie IgY im Huhn, besitzt es dennoch eine andere Domänenstruktur. Die Domänenstruktur von IgE dagegen entspricht zwar der vom IgY, allerdings sind die Bindungsaffinitäten der beiden Igs an deren spezifische Rezeptoren nicht vergleichbar. Die Bindungsaffinität des IgY-Fc-Fragments an CHIR-AB1 liegt im nanomolaren Bereich [8]. Dies entspricht ähnlichen Werten wie sie für die Bindung von IgG an seinen hoch affinen Rezeptor gesehen wurden. Für die Bindung von IgE an dessen hoch affinen Rezeptor wurden dagegen deutlich höhere Werte gemessen. Für die IgE:FcεRI-Interaktion konnte gezeigt werden, dass die Cε2-Domäne eine wichtige Rolle für die langsame Dissoziation vom Rezeptor spielt [30]. Die entsprechende Domäne im IgY, Cγ2, ist für die Interaktion mit CHIR-AB1 jedoch nicht von Bedeutung. Auch die Glykosilierungsstelle der Cγ3-Domäne im IgY, ist in den homologen Domänen von IgG (Cγ2) und IgE (Cε3) konserviert. Während Taylor et al. zeigte, dass durch eine Deglykosilierung von IgY die Bindung an eine Monozytenzelllinie nicht beeinflusst wurde [36], konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass eine Mutation im IgY, von N407 nach A407, sehr wohl die Bindung an CHIR-AB1 beeinflusst. Dieses Ergebnis konnte in zwei verschiedenen Assays gezeigt werden. Zur Klärung dieses Widerspruchs, muss an dieser Stelle die große Anzahl von CHIR-AB Homologen, die IgY alle mit unterschiedlicher Affinität binden, erwähnt werden [7]. Taylor et al. allerdings hat den Rezeptor der benutzten Zelllinie nicht näher beschrieben [30]. Somit könnte es sich um einen anderen

Rezeptor als CHIR-AB1 gehandelt haben, dessen Bindung an IgY nicht von der Glykosylierung abhängt.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten neben der Glykosylierungsstelle (N407), vier Aminosäurenreste (Y363, I364, H550, R556), die die Bindung von IgY an CHIR-AB1 direkt beeinflussen und drei Aminosäurenreste (L362, P554, M555), die die Bindung nur marginal beeinflussen, identifiziert werden (Abbildung 3 Publikation). Obwohl sich die Bindungsstellen auf zwei verschiedenen Domänen befinden, bildet die dreidimensionale Faltung des Ig eine enge Interaktionsstelle, bei der die Aminosäuren, die nur einen indirekten Einfluss auf die Interaktion mit CHIR-AB1 ausüben, sich an den äußeren Grenzen befinden (Abbildung 4 Publikation).

Für die Charakterisierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion wurden verschiedene Fusionsproteine generiert. Um die in die Bindung involvierten IgY Domänen zu detektieren, wurden vorerst schrittweise N-terminal verkürzte Fc ν -Konstrukte entwickelt. Diese Fusionsproteine wurden dann in zwei verschiedenen Assays, BWZ.36-Reporter Assay und FACS-Färbung einer stabil mit CHIR-AB1 transfizierten 2D8-Zelllinie, auf die Bindung an CHIR-AB1 hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nur die C ν 3/C ν 4-Domänen in die Bindung involviert sind.

Die verwendeten Fusionsproteine verbanden jeweils die humanen C γ 2- und C γ 3-Domänen mit dem entsprechenden IgY-Fc-Fragment. Obwohl die humanen IgG-Domänen in jedem Fusionsprotein vorhanden waren, wird nicht davon ausgegangen, dass sie die CHIR-AB1-Bindung, beispielsweise durch zusätzliche Interaktionen mit dem Rezeptor oder durch strukturelle Veränderungen am Molekül selbst, beeinflusst haben. Vergleicht man hierzu das Ergebnis des Fc ν 3-4-Konstrukt mit dem Ergebnis des Fc ν 2-4-Konstrukts, in dem eine Domäne (C ν 2) mehr vorhanden ist, war das zu detektierende Signal im BWZ.36-Reporter Assay gleich stark (Abbildung 1 Publikation). Auch konnte keinerlei Interaktion von humanen IgG1 mit CHIR-AB1 nachgewiesen werden (T. W. Göbel, nicht publizierte Daten).

Eine Bindung zwischen den C ν 3/C ν 4-Domänen entspricht einer Interaktion, wie sie auch für IgA1-Fc α RI gezeigt werden konnte. Dort wurden für die C-terminalen Domänen C α 2 und C α 3, drei bzw. 16 Aminosäurereste, die in diese Bindung involviert sind, charakterisiert [11]. Bei einem Sequenzvergleich der vorletzten und letzten Domänen von IgY mit IgA1, konnte eine Übereinstimmung von ca. 34% festgestellt werden. Bei einem Vergleich mit den homologen Domänen im IgG und

IgE, konnten dagegen für IgG, je nach Subklasse, nur eine 28-30%ige und für IgE eine 31%ige Übereinstimmung nachgewiesen werden [36].

Die IgY-Reste, die an identischen Positionen der 19 Aminosäuren im IgA1 lagen, wurden dann im Fc γ 3-4-Konstrukt mutiert und ebenfalls in den beiden oben genannten Assays auf ihre Bindung an CHIR-AB1 hin untersucht. Die für die Bindung wichtigen Aminosäurereste konnten auf zwei wesentliche Motive, die zwar auf verschiedenen Domänen liegen, aber auch im IgA1 existieren (L256, L257 und L258 in C α 2 und P440, L441, A442 und F443 in C α 3, auch als PLAF-Motiv bekannt) [40], beschränkt werden. Eine Ausnahme bildete hierbei H550, dieses befindet sich außerhalb des IgA1 PLAF-Motivs der C-terminalen Domäne. Elf der 19 für die Interaktion wichtigen Aminosäuren im IgA1, sind im IgY konserviert (Abbildung 2 Publikation). Für die IgY:CHIR-AB1-Interaktion sind jedoch nur drei dieser elf konservierten Aminosäuren wichtig: L362, H550 und P554. Die vier übrigen für die Interaktion wichtigen Aminosäuren, Y363, I364, M555 und R556, sind zwar nicht konserviert, da aber ähnliche Proteinsequenzen immer auch vergleichbare Molekülstrukturen hervorbringen [41], können auch in der Gesamtstruktur des Ig analoge Verhältnisse wie im IgA bestehen und eine ähnliche Bindungstasche für den Rezeptor gebildet werden.

Generell lieferten beide Assays zwar vergleichbare Ergebnisse, während man jedoch im BWZ.36-Reporter Assay immer ein deutlich positives von einem deutlich negativen Signal unterscheiden konnte, war dies bei der FACS-Färbung nicht möglich (Abbildung 3 Publikation). Dies spricht zwar für eine geringere Sensitivität dieses Assays, dennoch unterschieden sich letztendlich nur zwei Mutationen in ihren Endergebnissen voneinander (L362 und P554).

Durch die, in dieser Arbeit, erstellten Ergebnisse lassen sich auch Rückschlüsse auf die FcR-Evolution ziehen. Während beim Säuger nur einige FcRs, unter anderem Fc α RI und Fc γ 2R (Rind), auf Chromosom 19 im LRC kodiert sind, befinden sich die meisten FcRs in einem Bereich auf Chromosom 1. Es wird davon ausgegangen, dass es zu einer Genduplikation und nachfolgender Versprengung von Chromosom 19 auf Chromosom 1 kam. Während dieses Prozesses haben sich einige Merkmale der FcRs verändert. Dazu gehören die Verlagerung der Bindungsstelle von distal nach proximal und die damit verbundene Veränderung der Stöchiometrie von 2:1, wie sie für die Interaktion von IgY mit CHIR-AB1 und bei der IgA:Fc α RI-Interaktion

gezeigt wurde, hin zu einer 1:1 Stöchiometrie wie sie bei der Interaktion von IgG und IgE mit ihren spezifischen Rezeptoren vorkommt.

Kürzlich konnten Taylor et al. [42], neben den oben aufgeführten, drei weitere für die IgY:CHIR-AB1-Interaktion wichtige Aminosäurenreste benennen: L366, H495 und F557. R556 konnte, wie auch in der vorliegenden Arbeit, als ebenso wichtige Aminosäure definiert werden. Diese neu charakterisierten Reste liegen ebenfalls auf zwei verschiedenen Domänen, aber in der Gesamtstruktur dicht nebeneinander innerhalb der CH3/CH4-Region (Abbildung 3-1). Wie auch in der vorliegenden Arbeit, konnte somit eine Interaktionsstelle ähnlich derer im IgA1 gezeigt werden.

Während in der vorliegenden Arbeit Mutationen zu Alanin bzw. Arginin vorgenommen wurden, mutierten Taylor et al. zu Lysin, Glutamat bzw. Arginin. Mutationen können generell zu unvorhersehbaren allosterischen Effekten führen und somit unterschiedlichen Einfluss auf die Bindungen zeigen. So wird letztlich erst eine Kristallstruktur der IgY:CHIR-AB1-Interaktion, alle in die Bindung involvierten Aminosäuren charakterisieren können.

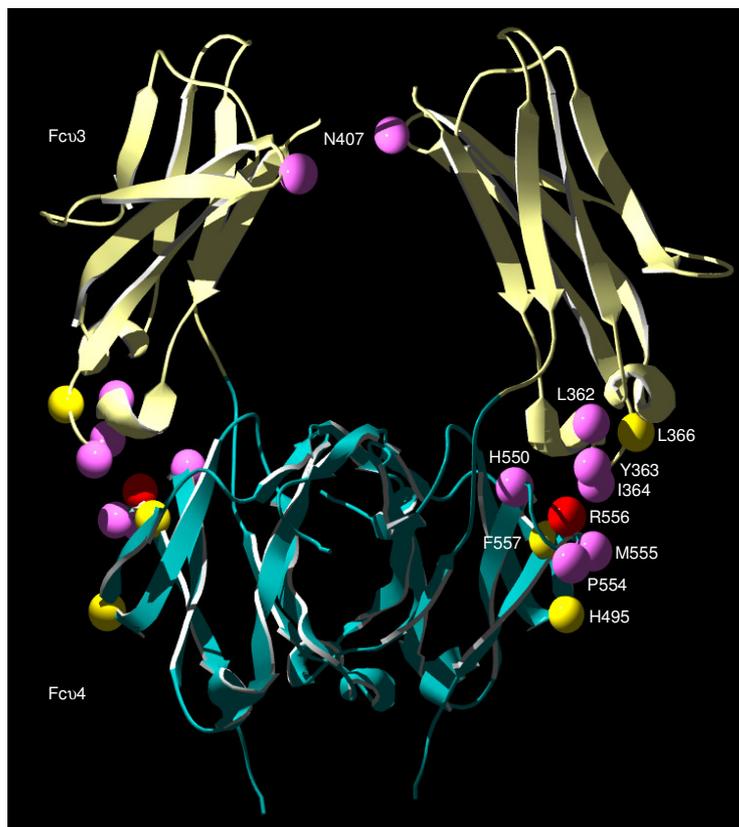


Abb. 3-1: Darstellung der bisher bekannten Aminosäuren.
 Rosa: Ergebnisse der vorliegenden Arbeit
 Gelb: von Taylor et al. charakterisierte Aminosäuren
 Rot: Aminosäure, die in beiden Arbeiten identifiziert wurde

4 Zusammenfassung

Hühner IgY, ein Vorgänger vom Säuger IgE und IgG, wird durch den hoch affinen Fc γ -Rezeptor CHIR-AB1, ein Mitglied der Leukozyten Rezeptor Familie, erkannt. Diese Studie charakterisierte die Rezeptor-Ligand-Interaktionsstelle, durch sukzessive Verkürzung der Fc ν IgY-Domänen und Mutationsanalysen ausgewählter Aminosäurenreste. Mit Hilfe verschiedener Fusionsproteine, welche die humanen C γ 2- und C γ 3-Domänen mit den entsprechenden Fc ν IgY-Domänen verbanden, konnte in einem Bindungsassay gezeigt werden, dass beide, die Fc ν 3 und die Fc ν 4 Domäne, eine wichtige Rolle für die Interaktion mit CHIR-AB1 spielen. Ein Sequenzvergleich von Hühner IgY mit humanen IgA zeigte, dass elf von 19 für die IgA-Fc α RI-Interaktion wichtigen Aminosäuren, im Hühner IgY konserviert sind, obwohl die Aminosäurenübereinstimmung lediglich 34% beträgt. Für die 19 an den entsprechenden Stellen liegenden Aminosäuren in IgY, konnte in zwei unabhängigen Assays gezeigt werden, dass durch die Mutation von zwei Resten in Fc ν 3 und von zweien in Fc ν 4, die Bindung an CHIR-AB1 komplett verhindert werden konnte. Drei weitere Mutationen konnten die Interaktion im Wesentlichen beeinflussen. Im Molekularmodell der C ν 3/C ν 4-Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass alle wichtigen Reste, obwohl sie auf unterschiedlichen Domänen liegen, eng benachbart sind. Die Rolle der Zuckerreste konnte durch die fehlende Interaktion mit CHIR-AB1, nach Mutation der Glykosilierungsstelle, gezeigt werden. Die Identifizierung der IgY C ν 3/C ν 4-Region, als wichtigen Bereich für die Interaktion mit CHIR-AB1, erhöht unseren Kenntnisstand bezüglich der IgY-Rezeptor-Interaktion und gestattet uns weitere Rückschlüsse bezüglich der FcR Phylogenie.

5 Summary

Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA:Fc α RI interaction

Chicken IgY, the ancestral form of mammalian IgE and IgG, is recognized by the high affinity FcY receptor CHIR-AB1, a member of the leukocyte receptor family. This study, has been characterized the receptor ligand interaction site by consecutive truncations of the Fc ν IgY domains and mutational analyses of selected residues. Using several fusion proteins that linked the human C γ 2 and C γ 3 domains with the Fc ν IgY domains, a binding assay revealed that both the Fc ν 3 and Fc ν 4 domains were essential for the IgY CHIR-AB1 interaction. Sequence comparisons of chicken IgY with human IgA demonstrated that 11 out of the 19 contact residues important for the IgA Fc α RI interaction have been conserved in chicken IgY, although the overall amino acid identity is only 34 %. Among the 19 amino acids at respective positions in IgY, the mutation of two residues in the Fc ν 3 and two in the Fc ν 4 domain completely abolished the IgY to CHIR-AB1 binding revealed by two independent assays. Three further mutations substantially altered the interaction. Molecular modeling on the C ν 3 to C ν 4 crystal structure revealed that all critical residues, although on two domains, are in close proximity. The importance of N-linked carbohydrates was demonstrated by the failure of CHIR-AB1 interaction after mutation of the glycosylation site. The identification of the IgY C ν 3/C ν 4 interdomain region as critical for binding to CHIR-AB1 significantly enhances our understanding of the IgY receptor interaction and allows further conclusions regarding the Fc receptor phylogeny.

6 Literaturverzeichnis

1. Colonna, M., *TREMs in the immune system and beyond*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**: p. 445-453.
2. Daeron, M., *Fc receptor biology*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 203-234.
3. Wende, H., et al., *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4*. Mammalian Genome, 1999. **10**: p. 154-160.
4. Martin, A.M., et al., *Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men*. Trends Immunol, 2002. **23**: p. 81-88.
5. Ding, Y., et al., *Crystal structure of the ectodomain of human Fc α RI*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 27966-27970.
6. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types*. Journal of Immunology, 2005. **175**: p. 385-393.
7. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors*. Journal of Immunology, 2009. **182**: p. 6985-6992.
8. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2007. **104**: p. 11718-11723.
9. Arnon, T.I., et al., *The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor*. Journal of Molecular Biology, 2008. **381**: p. 1012-1024.
10. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunology Today, 1995. **16**: p. 392-398.
11. Herr, A.B., E.R. Ballister, and P.J. Bjorkman, *Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc α RI and its complex with IgA1-Fc*. Nature, 2003. **423**: p. 614-620.
12. Monteiro, R.C. and J.G. Van De Winkel, *IgA Fc receptors*. Annual Review in Immunology, 2003. **21**: p. 177-204.
13. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc-receptors as regulators of immunity*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 179-204.
14. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc γ receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**: p. 34-47.
15. Ravetch, J.V., *Fc receptors*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**: p. 121-125.
16. Woof, J.M. and D.R. Burton, *Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**: p. 89-99.
17. Viertlboeck, B.C., et al., *A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters*. Journal of Immunology, 2009. **182**: p. 1533-1540.
18. Woof, J.M., et al., *Localisation of the monocyte-binding region on human immunoglobulin G*. Mol Immunol, 1986. **23**: p. 319-330.
19. Lund, J., et al., *Human Fc γ RI and Fc γ RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG*. J Immunol, 1991. **147**: p. 2657-2662.
20. Sondermann, P., et al., *The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ RIII complex*. Nature, 2000. **406**: p. 267-273.
21. Ravetch, J.V. and J.P. Kinet, *Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 457-492.
22. Pasquier, B., et al., *Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM*. Immunity, 2005. **22**: p. 31-42.
23. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc γ receptors: old friends and new family members*. Immunity, 2006. **24**: p. 19-28.

24. Wende, H., A. Volz, and A. Ziegler, *Extensive gene duplications and a large inversion characterize the human leukocyte receptor cluster*. Immunogenetics, 2000. **51**: p. 703-713.
25. 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**: p. 151-157.
26. Kowalczyk, K., et al., *Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken*. Immunology, 1985. **54**: p. 755-762.
27. Linden, C.D. and T.F. Roth, *IgG receptors on foetal chick yolk sac*. J Cell Sci, 1978. **33**: p. 317-328.
28. Tressler, R.L. and T.F. Roth, *IgG receptors on the embryonic chick yolk sac*. J Biol Chem, 1987. **262**: p. 15406-15412.
29. West, A.P., Jr., A.B. Herr, and P.J. Bjorkman, *The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog*. Immunity, 2004. **20**: p. 601-610.
30. Taylor, A.I., et al., *Avian IgY Binds to a Monocyte Receptor with IgG-like Kinetics Despite an IgE-like Structure*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**: p. 16384-16390.
31. Parvari, R., et al., *Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus*. Embo Journal, 1988. **7**: p. 739-744.
32. Abi-Rached, L., et al., *Episodes of natural selection shaped the interactions of IgA-Fc with Fc α RI and bacterial decoy proteins*. Journal of Immunology, 2007. **178**: p. 7943-7954.
33. Belov, K. and L. Hellman, *Immunoglobulin genetics of Ornithorhynchus anatinus (platypus) and Tachyglossus aculeatus (short-beaked echidna)*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2003. **136**: p. 811-819.
34. Mansikka, A., *Chicken IgA H chains. Implications concerning the evolution of H chain genes*. Journal of Immunology, 1992. **149**: p. 855-861.
35. Litman, G.W., M.K. Anderson, and J.P. Rast, *Evolution of antigen binding receptors*. Annual Review in Immunology, 1999. **17**: p. 109-147.
36. Taylor, A.I., et al., *The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE*. Biochemistry, 2009. **48**: p. 558-562.
37. Radaev, S. and P.D. Sun, *Recognition of IgG by Fc γ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 16478-16483.
38. Garman, S.C., et al., *Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc ϵ RI α* , in Nature. 2000. p. 259-266.
39. Hunt, J., et al., *Disulfide linkage controls the affinity and stoichiometry of IgE Fc ϵ 3-4 binding to Fc ϵ RI*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**: p. 16808-16814.
40. Pleass, R.J., et al., *Limited role of charge matching in the interaction of human immunoglobulin A with the immunoglobulin A Fc receptor (Fc α RI) CD89*. Immunology, 2003. **109**: p. 331-335
41. Dalal, S., S. Balasubramanian, and L. Regan, *Transmuting alpha helices and beta sheets*. Fold Des, 1997. **2**: p. R71-79.
42. Taylor, A.I., B.J. Sutton, and R.A. Calvert, *Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites*. Dev Comp Immunol, 2009. **34**: p. 97-101.

7 Persönliche Daten

Name:	Pürzel
Vorname:	Jana
Geburtsdatum:	19.07.1978
Geburtsort:	Werdau

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Göbel für die Überlassung des Themas und seine hervorragende fachliche Betreuung. Die stete Bereitschaft zur kritischen Diskussion war für mich von unschätzbarem Wert.

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

Besonderen Dank auch an Frau Dr. B. Viertlböck, die trotz Elternzeit immer ein offenes Ohr für mich fand.

Herrn Prof. Dr. B. Kaspers, Frau Prof. Dr. C. Deeg und Frau Dr. S. Kothlow danke ich für die konstruktiven Beiträge, die mir halfen mein Themengebiet aus anderen Blickwinkeln zu betrachten.

Ramona Schmitt möchte ich für die ausgezeichnete und vor allem geduldige Einarbeitung in die Methoden sowie für das angenehme Arbeitsklima danken.

Katharina Lochner danke ich für unsere unzählbaren privaten Gespräche und die gemeinsamen Pausen.

Mein Dank gilt ebenso meinen Mitstreitern, die mir stets fachlich sowie privat mit Rat und Tat zur Seite standen, mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Allen anderen Mitarbeitern danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die schöne gemeinsame Zeit.

Meiner Familie und besonders meinen Eltern, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben, möchte ich an dieser Stelle für ihre Unterstützung danken.

Bei Lina möchte ich mich für ihre Treue und die vielen ungesagten Worte bedanken.

Meinem Freund Thomas möchte ich für sein Verständnis und die moralische Unterstützung während meines Studiums und der Promotion herzlich danken.