

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

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

Mutationsstudien der Interaktion zwischen IgY und ggFcR

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

von
Barbara Schreiner
aus
Mallersdorf-Pfaffenberg

München 2012

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Göbel
Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	- 1 -
2	LITERATURÜBERSICHT	- 3 -
2.1	Fc Rezeptoren	- 3 -
2.1.1	Fc Rezeptoren – ein allgemein gehaltener Überblick.....	- 3 -
2.1.2	Humane Fc Rezeptoren	- 4 -
2.1.2.1	Fc γ R	- 5 -
2.1.2.2	Fc ϵ R	- 7 -
2.1.2.3	Fc α R.....	- 7 -
2.1.2.4	Kristallstrukturen der FcR und Interaktionen der FcR mit den jeweiligen Immunglobulinen	- 8 -
2.1.3	Fc Rezeptoren des Huhnes.....	- 10 -
2.1.3.1	IgY-bindende Rezeptoren.....	- 10 -
2.1.3.1.1	Fc-Rezeptor Y (FcRY)	- 10 -
2.1.3.1.2	Chicken Ig-like Rezeptor AB1 (CHIR-AB1).....	- 12 -
2.1.3.1.3	Gallus gallus Fc Rezeptor (ggFcR).....	- 14 -
2.1.3.2	Nicht-IgY-bindende Fc Rezeptoren	- 16 -
2.1.3.2.1	Gallus gallus polymerer Ig ähnlicher Rezeptor (ggpIgR)	- 16 -
2.1.3.2.2	Hühner Fc like Rezeptor (chFcR/L)	- 17 -
2.2	Immunglobuline des Huhnes	- 18 -
2.2.1	IgM	- 18 -
2.2.2	IgA.....	- 19 -
2.2.3	IgY.....	- 19 -
3	PUBLIKATION	- 22 -
4	DISKUSSION	- 42 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 47 -
6	SUMMARY	- 48 -

Inhaltsverzeichnis

7	LITERATURVERZEICHNIS	- 49 -
8	PERSÖNLICHE DATEN	- 52 -

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
BCR	B-Zell-Rezeptor
C _H	konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
CD3 ζ	ζ -Kette des CD3 T-Zell-Co-Rezeptors
chFcR/L	Hühner Fc like Rezeptor
CHIR	chicken Ig ähnliche Rezeptoren
CTLD	C Typ Lektin ähnliche Domäne
CysR	cysteinreiche Domäne
D	Domäne
DC	dendritische Zelle
Fc	konstante Region eines Antikörpers
FcR	Fc Rezeptoren
Fc γ	<i>common γ-chain (FcϵR1γ)</i>
FcR/L	Fc like Rezeptor
FcRY	Fc Rezeptor Y
FnII	Fibronektin Typ 2 Domäne
ggFcR	gallus gallus Fc Rezeptor
ggpIgR	gallus gallus polymerer Immunglobulin ähnlicher Rezeptor
GPVI	<i>platelet collagen receptor glycoprotein VI</i>
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin Super Familie
IL	Interleukin
INF	Interferon
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
KIR	Killer-Zellen Ig ähnliche Rezeptoren
LRC	Leukozyten Rezeptor Komplex
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	natürliche Killerzelle
NKp46	<i>natural cytotoxicity-triggering receptor</i>
PLA ₂ R	Phospholipase A2 Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
V _H	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörper

1 Einleitung

Fc Rezeptoren (FcR) gehören zur Gruppe der Immunorezeptoren. Sie sind bei der Infektionsabwehr von großer Bedeutung.

Das Immunsystem benötigt nicht nur hoch-affine Antikörper gegen Antigene um Toxine, Viren oder Bakterien abzutöten. Vielmehr können die meisten Pathogene nicht von Antikörpern allein neutralisiert werden, sondern müssen auf anderen Weg zerstört werden. Zum einen können Antigen-Antikörper-Komplexe das Komplementsystem aktivieren. Zum anderen können verschiedenste Effektorzellen angeregt werden. Dies geschieht, indem der konstante Teil eines Antikörpers an einen auf der Zelloberfläche sitzenden FcR bindet. Dadurch werden Zellen zu bestimmten Aktivitäten, wie z.B. Phagozytose oder Ausschüttung von bestimmten Botenstoffen, animiert [1].

Alle kiefertragenden Wirbeltiere besitzen die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren und es wurden bereits viele Immunglobulin Klassen beschrieben. Der Säuger produziert IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. Bei Vögeln, Reptilien, Amphibien, Knochen- und Knorpelfischen findet man außer dem hoch konservierten IgM noch weitere Ig, wie IgY, IgX, IgD, IgW und IgNAR [2]. Der vorherrschende Antikörper im Serum von Vögeln, Reptilien und Amphibien ist IgY. Er besitzt zusammen mit dem Säuger-IgG und dem Säuger-IgE einen gemeinsamen Ursprung [3]. IgY ist funktionell dem Säuger-IgG und strukturell dem Säuger-IgE sehr ähnlich [3].

Obwohl sehr viele Daten über Ig bei kiefertragenden Wirbeltieren vorliegen, gibt es, außer beim Säuger, kaum Informationen über FcR. Bis heute konnten nur wenige FcR bei anderen Wirbeltieren charakterisiert werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass sie existieren, da Funktionen wie Antikörper-mediierte Phagozytose beschrieben wurden.

Beim Huhn sind bis heute drei IgY-bindende FcR bekannt. FcRY ist ein FcR, der IgY über die Dottersackmembran in den Embryo transportiert. Er ist funktionell verwandt mit dem neonatalen FcR des Säugers, strukturell ist er das aviäre Homolog zum Phospholipase A2 Rezeptor (PLA₂R) [4].

CHIR-AB1 bindet IgY mit hoher Affinität und ist im Leukozyten Rezeptor Komplex (LRC) des Huhnes auf Mikrochromosom 31 lokalisiert [5].

Kürzlich konnte ggFcR, ein weiterer IgY-bindender FcR, auf Chromosom 20 des Huhnes beschrieben werden [6]. Er ist verwandt mit Rezeptoren des LRC, liegt aber

Einleitung

auf Chromosom 20 des Huhnes. In dieser Studie wurde die Interaktion zwischen IgY und ggFcR zum besseren Verständnis der Phylogenese der FcR genauer charakterisiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Fc Rezeptoren

2.1.1 Fc Rezeptoren – ein allgemein gehaltener Überblick

FcR gehören zur Familie der Immunorezeptoren, die auch T-Zell-Rezeptoren, B-Zell-Rezeptoren (BCR) und NK-Rezeptoren umfasst und deren Aufgabe es ist, Antigene zu erkennen [7]. Dabei erkennen FcR Antigene nicht direkt, sondern binden Antikörper oder Antigen-Antikörper-Komplexe. Sie binden den konstanten Teil (Fc) des Antikörpers und können so verschiedenste Zellaktivitäten auslösen [8]. Je nach Zellart kommt es zu verschiedenen Antworten der Zelle [1]. Bei Mastzellen und basophilen Granulozyten kann es zum Beispiel zur Freisetzung von vasoaktiven Substanzen und Chemokinen kommen [1]. Bei Makrophagen und neutrophilen Granulozyten kommt es zur Phagozytose oder zur Freisetzung von zytotoxischen Stoffen. Dendritische Zellen (DC) können Antigen phagozytieren und dann auf MHC Klasse I und Klasse II Molekülen präsentieren. Auf humanen B-Lymphozyten wird nur der hemmende Fc γ RIIB exprimiert, der Signale des BCR reguliert. Natürliche Killerzellen (NK) können bei Aktivierung durch FcR Antigen-präsentierende Zellen durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), z.B. durch Freisetzung von Perforin, töten [1].

Die meisten FcR sind Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie (IgSF). Deren Mitglieder verfügen über mindestens eine extrazelluläre Ig Domäne.

Für jedes Ig gibt es bestimmte FcR, die dann nach dem jeweiligen Antikörper benannt werden (Fc γ R für IgG, Fc α R für IgA, Fc ϵ R für IgE, Fc μ R für IgM, Fc δ R für IgD) [8].

Es werden FcR mit hoher und niedriger Affinität zu ihrem Liganden beschrieben [8]. FcR mit niedriger Affinität können nur in Komplexen vorliegende Ig binden. FcR mit hoher Affinität können auch monomere Antikörper messbar binden [8].

Außerdem unterscheidet man aktivierende und hemmende FcR, die man auch auf derselben Zelle finden kann [9]. Die hemmenden und aktivierenden Rezeptoren einer Zelle regulieren sich gegenseitig, wodurch die Immunantwort der Zelle in Balance gehalten wird [10]. Pathologisch vermehrte Aktivierung oder ein Fehlen von hemmenden Signalen können zu Autoimmunerkrankungen führen. Im Gegenzug kann eine Ermangelung von aktivierenden Signalen zu einer ungenügenden

Immunantwort auf Infektionen führen [11]. Aktivierende Rezeptoren interagieren über ihre transmembrane Region mit einem Adaptermolekül, das ein ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) enthält [9]. Ein ITAM besteht aus einer sich zweifach wiederholenden YxxL Sequenz mit variablem Rest [8]. Als Adaptermolekül interagiert z.B. die Fc γ mit Fc γ RI [9]. Eine Ausnahme stellen die humanen Fc γ RIIA/ Fc γ RIIC dar, deren ITAM im Rezeptor selbst enthalten sind [9], [12]. Hemmende Rezeptoren besitzen im langen zytoplasmatischen Teil ein ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif). Dieses besteht aus einer einzelnen YxxL Sequenz [8]. Ferner existieren noch FcR, die weder aktivierend noch hemmend agieren. Diese Rezeptoren machen die Transzytose von Antikörpern durch Epithelzellen möglich [8]. Beispiele hierfür sind der humane polymere Ig Rezeptor (pIgR) für IgA und IgM, der neonatale FcR für IgG beim Säuger oder der polymere Ig Rezeptor (ggpIgR) beim Huhn [8, 13]

Bei Bindung eines Antigen-Antikörper-Komplexes an einen aktivierenden FcR kommt es zur Quervernetzung der FcR, was zu einer Phosphorylierung des ITAM durch Src Kinasen führt. Dadurch werden zytoplasmatische Protein Tyrosin Kinasen der Syk Familie aktiviert [8]. Diese Kinasen regen wiederum zytoplasmatische Enzyme, wie Phospholipidkinasen (z.B. Phosphatidylinositol-3-Kinase) oder Phospholipasen (z.B. Phospholipase C γ), an. Schließlich wird die Proteinkinase C aktiviert und es wird Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma ausgeschüttet, was die Aktivierung der Zelle zur Folge hat [10].

Bei Bindung eines Immunkomplexes an einen hemmenden FcR, wie z.B. an den humanen Fc γ RIIB auf B-Lymphozyten, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet [1].

2.1.2 Humane Fc Rezeptoren

FcR wurden beim Menschen für IgG, IgE und IgA genauer charakterisiert. Im Folgenden werde ich Fc γ R für IgG, Fc ϵ R für IgE und Fc α R für IgA genauer betrachten [14].

2.1.2.1 Fc γ R

FcR, die an den Fc Teil des humanen IgG binden, werden in drei Klassen eingeteilt: Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII [15].

Fc γ RI (= CD64) findet man auf Monozyten und Makrophagen [15]. Er kann monomeres IgG mit hoher Affinität binden [14]. Im Gegensatz zu allen anderen humanen FcR besitzt Fc γ RI drei extrazelluläre Ig Domänen. Es wird angenommen, dass diese zusätzliche Domäne wichtig für die hohe Affinität der Bindung zu IgG sein könnte [14].

Fc γ RII (= CD32) wird nochmals unterteilt in Fc γ RIIA, Fc γ RIIB und Fc γ RIIC. Diese Rezeptoren sind strukturell zwar verwandt, werden aber von verschiedenen Genen kodiert [14]. Fc γ RII findet man vor allem auf Monozyten und Makrophagen [14]. Fc γ RII bindet IgG mit niedriger Affinität, kann aber ein breiteres Spektrum von Isotypen binden [14]. Fc γ RII besitzt zwei extrazelluläre Ig Domänen. Während bei Fc γ RIIA/Fc γ RIIC im zytoplasmatischen Teil ITAM vorhanden sind, sitzt bei Fc γ RIIB im zytoplasmatischen Ende ein ITIM [9]. Darum ist Fc γ RIIB ein wichtiger hemmender FcR. Man findet diesen Rezeptor auf allen Leukozyten, mit Ausnahme von NK- und T-Zellen [9]. Wie im Überblick schon angesprochen, kann unkontrollierte Bindung von Antigen-Antikörper-Komplexen zu Autoimmunantworten führen. Darum muss die Antikörper-Spezifität und der Klassenwechsel stark kontrolliert werden. Dafür gibt es zentrale und periphere Kontrollpunkte, die autoreaktive Antikörper aussortieren [16]. Fc γ RIIB ist so ein peripherer Kontrollpunkt. Denn bei simultaner Aktivierung von BCR und Fc γ RIIB durch Antigen-Antikörper-Komplexe kann der Calcium-Einstrom von Fc γ RIIB inhibiert werden und so die Aktivierung der Zelle verhindert werden [16].

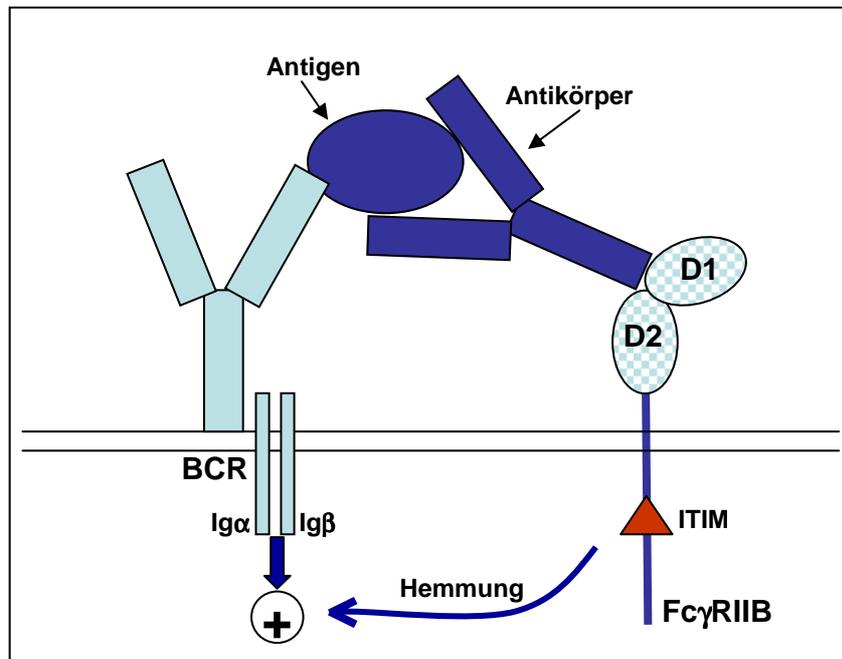


Abb. 1: Schematische Darstellung der simultanen Aktivierung von BCR und FcγRIIB durch einen Antigen-Antikörper-Komplex.

Überdies kann eine alleinige Aktivierung von FcγRIIB durch die Rekrutierung von Tyrosin Kinasen (BTK, JNK) die Apoptose von B-Zellen induzieren [1, 17]. Fernerhin greift FcγRIIB auch in das angeborene Immunsystem ein [16]. Hier werden Antikörper-mediierte Antworten von Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten unter Kontrolle gehalten, um eine überschießende Entzündungsreaktion zu verhindern [16].

Bei Knockout Mäusen, die keinen FcγRIIB exprimieren, kommt es zur Bildung von Auto-Antikörpern und Entwicklung von Lupus-ähnlichen Krankheiten und Glomerulonephritis [18]. Diese Tatsache verdeutlicht die wichtige Rolle, die FcγRIIB als hemmender FcR spielt.

FcγRIII (= CD16) besitzt zwei Ig Domänen und bindet IgG mit niedriger Affinität [14]. FcγRIII wird unterteilt in FcγRIIIA und FcγRIIIB.

FcγRIIIA ist ein transmembranes Protein mit einem zytoplasmatischen Teil und wird von NK-Zellen und Makrophagen exprimiert. FcγRIIIA benötigt Fcγ oder CD3ζ für die Expression auf der Zelloberfläche [14].

FcγRIIIB ist durch einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-Rest auf der Zellmembran verankert und ist ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten zu finden [14].

Fc γ RIIIA ist von großer Bedeutung im angeborenen Immunsystem, da es beim Mechanismus der ADCC maßgeblich beteiligt ist. Fc γ RIIIA wird auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert und bindet den Fc Teil des IgG. Dieses wiederum kann Antigene auf Antigen-präsentierenden Zellen binden. So stellt Fc γ RIIIA und IgG eine Verbindung zwischen der Antigen-präsentierenden Zelle und der NK-Zelle her. Die NK-Zelle kann so auf das Antigen reagieren und tötet die Antigen-präsentierende Zelle mit Hilfe von Perforin oder Granzymen ab [19].

2.1.2.2 Fc ϵ R

Beim Menschen findet man Fc ϵ RI und Fc ϵ RII.

Fc ϵ RII stammt aus der Familie der C Typ Lektine und wurde bis heute nicht weiter charakterisiert.

Fc ϵ RI kann mit sehr hoher Affinität humanes IgE binden [14]. Dieser Rezeptor wird nur auf Mastzellen und basophilen Granulozyten exprimiert und induziert allergische Reaktionen. Dabei bindet zuerst freies IgE an den Fc ϵ RI, woraufhin das Antigen an IgE binden kann. Durch Quervernetzung des Rezeptors degranuliert die Zelle und es werden Histamin, Arachidonsäure-Metaboliten und Leukotriene ausgeschüttet. Zusätzlich werden viele Zytokine freigesetzt, wie z.B. TNF- α , INF- γ und IL 1 – 6 [14].

2.1.2.3 Fc α R

Die wichtigsten FcR beim Menschen für IgA sind der Fc α RI (CD89), der polymere Ig Rezeptor für IgA/IgM und Fc α / μ R.

Im Rahmen dieser Arbeit werde ich mich auf den Fc α RI konzentrieren, da er für diese Studie von größter Bedeutung ist.

Fc α RI (= CD89) bindet beide IgA Isotypen mit geringer bis mittlerer Affinität [7].

Dieser FcR wird auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und auf Kupfferschen Sternzellen exprimiert. Fc α RI kommuniziert mit Fc γ und aktiviert die Zelle [7]. Das Gen für Fc α RI liegt auf Chromosom 19 in der Region des LRC [7]. Es ist bekannt, dass Fc α RI mit Rezeptoren des LRC (z.B. KIR) enger verwandt ist als mit klassischen FcR. Ein Merkmal hierfür ist das Signalpeptid von Fc α RI, das von zwei Exons kodiert wird,

wobei das zweite genau 36 Basenpaare lang ist [7]. Dies ist ein Charakteristikum von Genen des LRC [6]. Ferner ist beschrieben, dass Fc α RI und der bovine Fc γ 2R eng verwandt sind [7, 20]. Man vermutet, dass Fc α RI und Fc γ 2R eine separate Gruppe von FcR bilden, die aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sind [7].

FcR	Isoformen	signalgebendes Motiv	Affinität
Fc γ RI (CD64)	Fc γ RIA	ITAM in γ -Kette	hoch
Fc γ RII (CD32)	Fc γ RIIA	ITAM in α -Kette	niedrig
	Fc γ RIIA	ITAM in α -Kette	niedrig
	Fc γ RIIB	ITIM in α -Kette	niedrig
	Fc γ RIIC	ITAM in α -Kette	niedrig
Fc γ RIII (CD16)	Fc γ RIIIA	ITAM in γ -Kette	mittel
	Fc γ RIIIB	kein Signalmotiv in der Membran verankert	niedrig
Fc ϵ RI	Fc ϵ RI	ITAM in γ -Kette	sehr hoch
Fc α RI (CD89)	Fc α RIA	ITAM in γ -Kette	mittel

Abb. 2: Zusammenfassung der wichtigsten humanen FcR

2.1.2.4 Kristallstrukturen der FcR und Interaktionen der FcR mit den jeweiligen Immunglobulinen

Bis heute sind die Kristallstrukturen von Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIB, Fc ϵ RI und Fc α RI verfügbar [12]. Diese Kristallstrukturen wurden von den extrazellulären Ig Domänen angefertigt, nicht vom zytoplasmatischen Teil [12]. Die Kristallstrukturen von Fc γ RIIA,

Fc γ RIIB, Fc γ RIIIB, Fc ϵ RI sind sich alle sehr ähnlich: Domäne 1 (D1) und Domäne 2 (D2) sind jeweils aus zwei übereinanderliegenden β -Faltblättern aufgebaut. Sie stehen in einem Winkel von 70° zueinander, sodass eine große Kontaktfläche zwischen den beiden Domänen entsteht [12]. D1 und D2 von Fc α RI sind zwar auch im 70° Winkel angeordnet, aber die Domänen sind um 180° gedreht, was zu einer umgekehrten Orientierung der Domänen führt. Diese Struktur ähnelt mehr den Rezeptoren des LRC. [12].

Die Kristallstruktur des Komplexes Fc γ R/IgG wurde für den humanen Fc γ RIII und IgG1 angefertigt [12]. Dabei sitzt die D2 Domäne des Rezeptors zwischen den beiden Fc γ 2 Domänen der schweren Kette des IgG. Hier befindet sich die untere Gelenkregion des IgG. Es bindet also die D2 und die Verbindungsregion von D1/D2 des Rezeptors an beide Fc γ 2 Domänen des IgG1. So entsteht eine 1:1 Bindungsstöchiometrie [12].

Bei der Interaktion von Fc ϵ R zu IgE hat man zwei Bindungsstellen: Zum einen bindet die D2 des Rezeptors an C ϵ 3 und an die Region zwischen C ϵ 2 und C ϵ 3. Zum anderen bindet die Kontaktfläche zwischen D1 und D2 des Rezeptors an die C ϵ 3 der zweiten schweren Kette des IgE [12]. Diese Komplexbildung erinnert stark an den Fc γ R/IgG-Komplex, da der Rezeptor wieder zwischen den beiden schweren Ketten des IgE sitzt und so wieder eine 1:1 Stöchiometrie entsteht. Außerdem ist die C ϵ 2-C ϵ 3-Verbindungsstelle das Äquivalent zur unteren Gelenkregion des IgG [12].

Im starken Gegensatz hierzu steht die Interaktion zwischen Fc α RI und IgA [12].

Im Rahmen von Mutationsanalysen wurde entdeckt, dass Fc α RI sowohl an Aminosäuren der C α 2 als auch an Reste der C α 3 bindet, welche die vorletzte und letzte Domäne der schweren Kette des IgA darstellen. Außerdem bindet nicht D2 des Fc α RI, sondern die Membran-distale D1 an IgA. Infolgedessen beträgt die Bindungsstöchiometrie Fc α RI:IgA 2:1 [12].

Es ist bekannt, dass die Bindung von Fc α RI an IgA durch Proteine von Streptokokken (Sir22, Arp4, β -Protein) blockiert werden kann [21]. Auf diese Weise wird die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten durch Fc α RI verhindert [21].

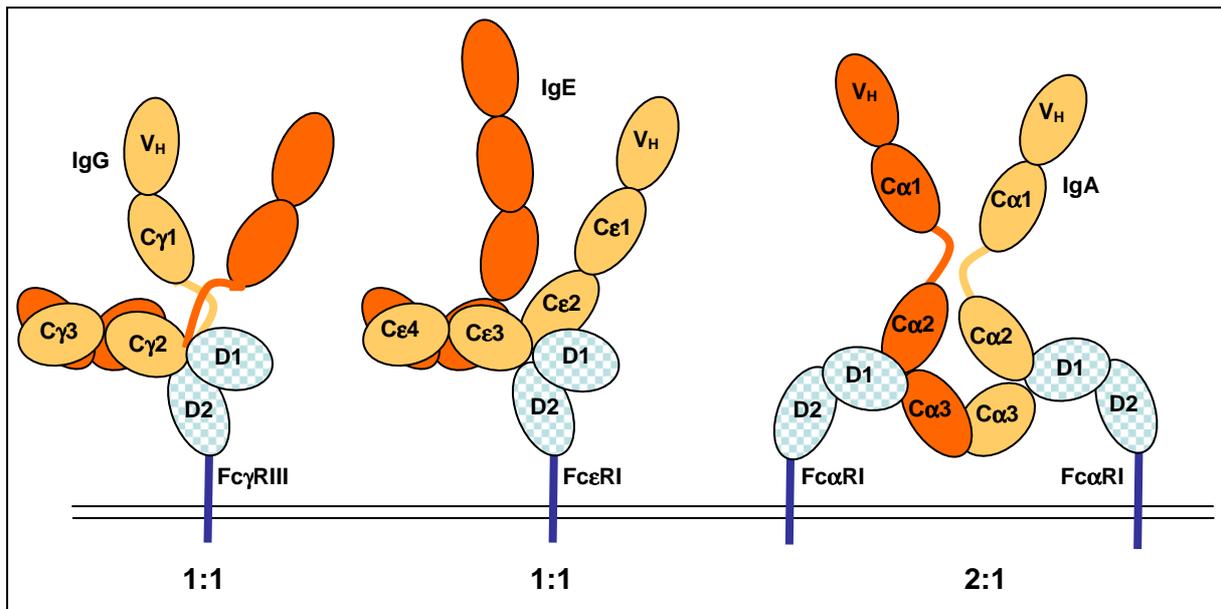


Abb 3: Interaktionen zwischen den FcR mit ihren jeweiligen Antikörpern. Auf die leichten Ketten der Antikörper wurde zur besseren Übersicht verzichtet.

2.1.3 Fc Rezeptoren des Huhnes

Im Anschluss werde ich alle bis jetzt beschriebenen FcR des Huhnes genauer betrachten, wobei ich sie in IgY-bindende und nicht-IgY-bindende FcR unterteile.

2.1.3.1 IgY-bindende Rezeptoren

2.1.3.1.1 Fc-Rezeptor Y (FcRY)

Ein IgY-bindender Rezeptor ist FcRY. Dieser Rezeptor ist funktionell verwandt mit dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) des Säugers.

Passive Immunität wird sowohl beim Säuger als auch beim Vogel von der Mutter auf den Fetus übertragen. Beim Säugetier wird IgG entweder über die Plazenta (unter anderem beim Mensch) oder nach der Geburt über das Kolostrum (z.B. Rind) in den Fetus transportiert. In beiden Fällen wird IgG über Transzytose durch den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) übertragen [22]. FcRn wird beim Nager vor allem im neonatalen Dünndarm und beim Menschen in den Synzytiotrophoblasten exprimiert [22-24].

FcRn hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem MHC Klasse I Molekül, wobei die Bindungsstelle für das Antigen, welches den T-Lymphozyten präsentiert wird, nicht funktional ist [25].

FcRn kann im sauren Milieu (pH 6,8) der Endosomen IgG binden, im leicht basischen pH des Blutes (pH 7,4) ändert sich die Konformation des FcRn und der Ligand wird abgegeben [22].

Beim Vogel wird IgY über die Dottersackmembran in den Embryo transportiert. Dies geschieht durch FcRY. Dieser Rezeptor ähnelt nur funktionell dem FcRn des Säugers. Er ist jedoch das aviäre Homolog des sekretorischen PLA₂R. Dieser ist ein Mitglied der Mannose-Rezeptor Familie [4] und ihm werden als einziges Mitglied dieser Familie transzytotische Fähigkeiten zugesprochen [24]. Die Bindungsaktivität des FcRY ist identisch mit der von FcRn. Im Sauren kann FcRY mit nanomolarer Affinität IgY binden, im Basischen verliert der Rezeptor seine Bindungsfähigkeit durch Konformationsänderung [26]. Strukturell hingegen ist FcRY verwandt mit dem PLA₂R. Beide besitzen eine N-terminale cysteinreiche Domäne (CysR), eine Fibronectin Typ II Domäne (FNII) und acht C-Typ Lektin ähnliche Domänen (CTLDs) [4].

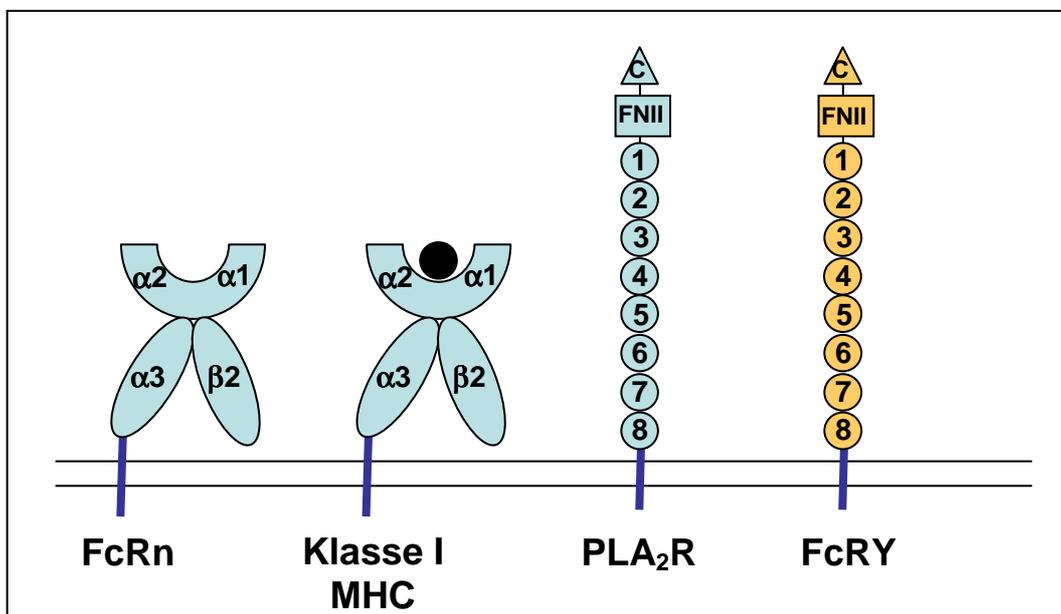


Abb.4: Schematische Darstellung von FcRn, FcRY und ihren verwandten Molekülen

Die Bindungsstöchiometrie von FcRY zu IgY bei einem pH von ~6 beträgt 2:1 [4]. Durch Einfalten der N-terminalen cysteinreichen Domäne und der FNII Domäne

nehmen diese beiden Domänen Kontakt zu den CTLDs 1-6 auf und formen so ein „Köpfchen“, das aus zwei Ringen besteht. Der erste Ring besteht aus CysR, FNII und den CTLDs 1-2, der zweite Ring wird von den CTLDs 3-6 gebildet. Die CTLDs 7 und 8 bilden den flexibleren Schwanz [27]. FcRY kann mit der Kopfregion die CH₄ Domäne einer Kette des IgY Dimers binden. Hierbei wird die Verbindung zwischen FNII und CTLD 6 genutzt, um die CH₄ Domäne einer schweren Kette des IgYs zu binden. Aus diesem Grund benötigt FcRY die gesamte Kopfregion um an IgY binden zu können [27].

Diese Konformation geht bei einem pH-Wert ab ~ 7,4 verloren. Das Molekül liegt dann wieder in seiner gestreckten Form vor und kann kein IgY mehr binden [27]. FcRn und FcRY sind ein Beispiel für konvergente Evolution. Sie haben, obwohl sie völlig unterschiedliche Moleküle in verschiedenen Spezies darstellen, durch gleiche Umwelteinflüsse identische Funktion übernommen.

2.1.3.1.2 Chicken Ig-like Rezeptor AB1 (CHIR-AB1)

CHIRs werden eingeteilt in aktivierende (CHIR-A), hemmende (CHIR-B) und bifunktionale (CHIR-AB) Rezeptoren [28]. Sie besitzen entweder ein oder zwei C2 Typ Ig Domänen. Die CHIR Gene wurden auf dem LRC des Huhnes, der auf dem Mikrochromosom 31 lokalisiert ist, gefunden [8]. Beim Menschen liegt der LRC auf Chromosom 19q13.4 [29]. Im humanen LRC findet man einige Multigen-Familien [30]. Dazu gehören die Killer-Zellen Ig ähnlichen Rezeptoren (KIR), die Leukozyten Ig ähnlichen Rezeptoren, die Leukozyten assoziierten Ig ähnlichen Rezeptoren, der GPVI (platelet collagen receptor glycoprotein VI) und NKp46 (natural cytotoxicity-triggering receptor) [31]. Weiter zentromer findet man noch weitere Ig ähnliche Rezeptorfamilien, wie SIGLEC (sialic acid-binding Ig-like lectins) und CEACAM (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule) [32]. Überdies liegt im humanen LRC auch das Gen für Fc α RI, der näher verwandt ist mit den Rezeptoren des LRC als mit klassischen FcR [7]. Beim Menschen liegen im LRC 30 Ig ähnliche Rezeptoren [33]. Beim Huhn sind es weit mehr: Man hat bis heute über hundert CHIR-Gene gefunden [34].

Bisher konnte nur bei CHIR-AB1 eine Bindung von Hühner-IgY mit hoher Affinität nachgewiesen werden [5]. Das heißt, dass CHIR-AB1 auch IgY-Monomere binden kann. Zur Calciumfreisetzung benötigt der Rezeptor jedoch Hitze-aggregiertes, d.h. kreuzvernetztes IgY [5].

CHIR-AB1 ist auf reifen und unreifen B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen zu finden [5]. Er besteht aus einer extrazellulären C2-Typ-Ig-Domäne, einer transmembranen Region mit der positiv geladener Aminosäure Arginin und besitzt zudem ein ITIM [5]. CHIR-AB1 ist daher ein potentiell bifunktionaler Rezeptor. Er kann durch die positiv geladene Aminosäure der transmembranen Region mit dem Adaptermolekül $Fc\gamma$, das ein ITAM enthält, in Kontakt treten und so eine Aktivierung der Zelle hervorrufen. Gleichzeitig besitzt er mit dem zytoplasmatisch liegenden ITIM ein hemmendes Motiv. Bis heute wurde jedoch keine hemmende Funktion nachgewiesen [32].

CHIR-AB1 kann in Abwesenheit von $Fc\epsilon R1\gamma$ zwar auf der Zelloberfläche exprimiert werden, aber es kommt nicht zur Calciumfreisetzung [5].

Aus Mutationsanalysen ist bekannt, dass für die Bindung von CHIR-AB1 und IgY des Huhnes die CH_3 und die CH_4 Domäne des IgYs notwendig sind. Sowohl Aminosäuren der CH_3 als auch der CH_4 Domäne bilden die Bindungsstelle für CHIR-AB1 [35-36]. Dabei beträgt die Bindungstöchiometrie von CHIR-AB1 zu IgY 2:1 [35]. Dies beobachtet man auch bei $Fc\alpha R1$ (CD89), dessen Bindungsstelle für IgA auch von $Fc\alpha 3$ und $Fc\alpha 4$ gebildet wird [12].

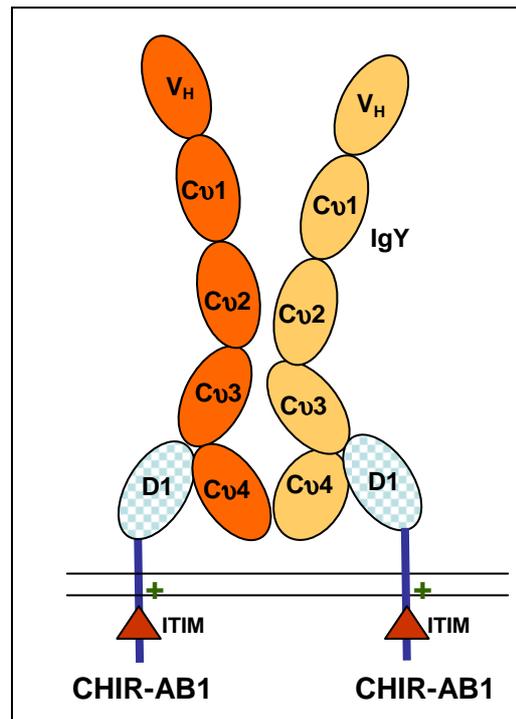


Abb. 5: Interaktion zweier CHIR-AB1 mit den schweren Ketten eines IgY Moleküls. Zur besseren Übersicht wurden die leichten Ketten des IgY nicht dargestellt.

CHIR-AB1 ist der einzige klassische FcR, der Homodimere bilden kann. Die Dimerisation ist nicht obligatorisch, CHIR-AB1 kann in Lösung sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen [37]. Nötig für die Dimerbildung ist das positiv geladene Arginin 72, das mit dem gegenüberliegenden negativ geladenen Asparagin 44 eine Salzbrücke ausbildet und so jeweils zwei Monomere zusammenfügt [37].

CHIR-AB2 bildet keine Dimere. Ursache hierfür ist vermutlich, dass Asparagin 44 nicht konserviert ist und an dessen Stelle ein Lysin sitzt. Möglicherweise ist die fehlende Dimerisation von CHIR-AB2 der Grund, warum dieser Rezeptor kein IgY mehr binden kann [37].

2.1.3.1.3 Gallus gallus Fc Rezeptor (ggFcR)

Ein weiterer FcR des Huhnes ist ggFcR, der IgY mit niedriger Affinität bindet [6]. Er besteht aus vier extrazellulären C2-Typ Ig Domänen, einer transmembranen Region

mit einem positiv geladenen Arginin und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz [6].

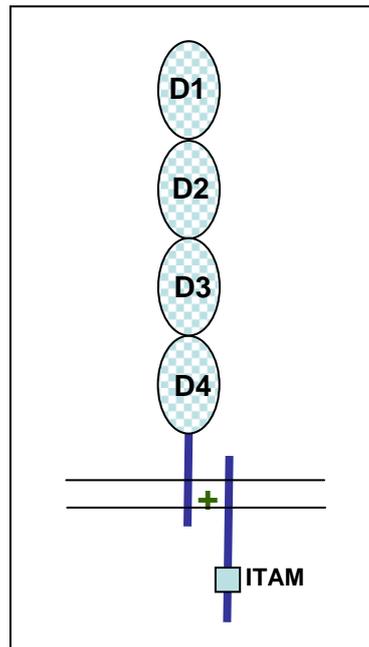


Abb. 6: Aufbau des gallus gallus Fc Rezeptors

Das positiv geladene Arginin weist darauf hin, dass ggFcR ein aktivierender Rezeptor ist. Dieses Arginin interagiert mit $Fc\gamma$ des $Fc\epsilon R1\gamma$. Nur im Beisein von $Fc\gamma$ kann ggFcR auf der Zelloberfläche exprimiert werden [6]. Mehrere Tatsachen weisen darauf hin, dass das Gen, das für ggFcR kodiert, mit Genen aus dem LRC verwandt ist. So zeigen zum einen phylogenetische Analysen die Verwandtschaft zu Genen des LRC auf [6]. Zum anderen wird das Signalpeptid des ggFcR von zwei Exons kodiert, wobei das zweite Exon 36 Basenpaare lang ist. Dies ist typisch für Gene des LRC [6]. Außerdem findet man in der transmembranen Region ein NxxR Motiv, welches spezifisch für Gene der LRC ist [38]. Dieses fehlt in Genen für klassische FcR, CHIR und KIR, ist aber im humanen $Fc\alpha R$, im Xenopus FcRL und im ggFcR enthalten [6, 38]. Überraschenderweise liegt das ggFcR-Gen nicht im LRC, sondern auf Chromosom 20 des Huhnes [6]. Die syntenische Region des Hühner-Chromosoms 20 ist das humane Chromosom 20. Viertlböck et al. konnten zeigen, dass Gene des Chromosoms 20 des Huhns auch beim Menschen auf Chromosom 20 zu finden sind, wenn auch in anderer Anordnung. Ein Gen für einen Ig ähnlichen Rezeptor fehlt jedoch auf dem humanen Chromosom 20 [6].

2.1.3.2 Nicht-IgY-bindende Fc Rezeptoren

2.1.3.2.1 Gallus gallus polymerer Ig ähnlicher Rezeptor (ggplgR)

GgplgR wird in Darm, Bursa fabricii, Leber und Thymus des Huhnes exprimiert [13]. Dieser Rezeptor besteht aus einem N-terminal liegenden Signalpeptid, vier extrazellulären Ig Domänen, einer transmembranen Region und einer zytoplasmatischen C-terminalen Region [13]. GgplgR sitzt, wie beim Säuger, auf der basolateralen Seite von Epithelzellen und bindet polymeres IgA an der für die Polymerisation wichtigen J-Kette [13, 39]. Durch Transzytose wird ggplgR und das gebundene polymere IgA in die Epithelzelle aufgenommen und dadurch das IgA auf die luminalen Seite transportiert [13]. Dort wird der extrazelluläre Teil des Rezeptors abgespalten und bildet mit IgA den sekretorischen IgA-Komplex. Dieser wird in Galle oder Fäzes abgegeben [13].

Der plgR beim Säuger besitzt fünf extrazelluläre Ig Domänen, das Huhn hat also eine Ig Domäne weniger [13]. Wieland et al. konnten zeigen, dass sich für die Domäne 2 kein Ortholog im Hühnergenom befindet [13]. Domäne 2 und 3 übernehmen beim Säuger bei der IgA-Bindung eine wichtige Rolle zur Stabilisation des IgA [40]. Das IgA des Huhnes enthält, anders als das Säuger-IgA, keine Gelenkregion [41]. Diese Tatsache macht das Säuger-IgA flexibler und instabiler. Folglich benötigt das Säuger-IgA mehr Stabilisation, was die Aufgabe der Domäne 2 sein könnte [13].

Die vier Ig Domänen von ggplgR werden jeweils von einem Exon kodiert [13]. Diese eine-Domäne/ein-Exon-Regel ist ein Charakteristikum der IgSF [42].

Das Gen für ggplgR befindet sich auf Chromosom 26 (unveröffentlichte Beobachtung T. Göbel). Es hat sich noch vor Differenzierung von Vögel und Reptilien entwickelt. Dies zeigt, dass sekretorisches IgA auch eine wichtige Rolle in der mukosalen Abwehr bei vielen Nicht-Säugetieren einnimmt [13].

Es handelt sich bei ggplgR um einen weiteren FcR des Huhnes. Dieser Rezeptor bindet jedoch nur polymeres IgA. Er kann kein IgY binden. Überdies konnte nicht nachgewiesen werden, dass er, anders als beim Säuger, IgM bindet [13].

Es scheint, dass sich FcR / FCR/L des Säugers und chFcR/L aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben [44]. Hier stellt sich die Frage, ob Vögel alle anderen FcR / FCR/L Gene verloren haben oder ob sich weitere FcR / FCR/L der Säuger erst nach Aufteilung der Klasse Aves und der Klasse Mammalia aus dem gemeinsamen Vorfahren entwickelten [44]. Primaten, Nager und der Hund als Vertreter der Eutheria sowie das Opposum als Vertreter der Metatheria besitzen sowohl klassische FcR und FcR/L als auch intrazelluläre FcR/L A und FcR/L B [46]. Beim Huhn als Vertreter der Aves findet man nur den chFcR/L [44]. Das könnte bedeuten, dass klassische FcR, FcR/L und FcR/L A/B erst nach Auftrennung von Säugetier und Vogel entstanden sind, jedoch vor Untergliederung der Säugetiere in Plazenta- und Beuteltiere [46].

Abschließend möchte ich betonen, dass FcR/L den Fc-Teil von Ig nicht binden können, auch chFcR/L kann kein IgY binden [44]. 2010 konnten Schreeder et al. zeigen, dass der humane FcR/L-6 ein MHC Klasse II Molekül (HLA-DR) bindet [47]. Weitere Liganden für FcR/L sind bis heute nicht bekannt.

2.2 Immunglobuline des Huhnes

Die Ig beim Vogel unterteilen sich in IgM, IgA und IgY.

IgD und IgE sind beim Vogel nicht zu finden. Im Folgenden werde ich kurz die aviären Ig vorstellen und sie mit ihrem humanen Gegenstück vergleichen.

Das Grundgerüst sowohl der humanen als auch der aviären Ig wird von zwei schweren und zwei leichten Ketten gebildet. Leichte und schwere Ketten bestehen aus einem variablen und einem konstanten Teil.

2.2.1 IgM

Die schwere Kette des humanen IgM setzt sich aus fünf Domänen (V, C μ 1 – C μ 4) zusammen [19]. Das aviäre IgM ist strukturell homolog zum IgM des Menschen [48].

Das humane IgM liegt als Pentamer vor. Diese Polymerisation kommt durch die J-Kette zustande [19]. Beim Huhn liegt IgM als Tetramer oder als eine Mischung aus Tetramer und Pentamer vor [49].

Wie beim Menschen ist das aviäre IgM die vorherrschende Form bei einer ersten Immunantwort auf ein neues Antigen, wobei IgM nur kurze Zeit vorliegt [48].

2.2.2 IgA

Anders als beim Menschen besteht die schwere Kette des IgA beim Vogel aus fünf Domänen (V, C α 1 – C α 4) [41]. Die aviäre C α 2 Domäne wurde beim Menschen zur Gelenkregion kondensiert [41].

IgA liegt beim Menschen, verbunden durch die J-Kette, als Dimer vor [19]. So kann es mit Hilfe des polymeren Ig Rezeptors (pIgR) durch Epithelzellen transportiert werden. Beim Huhn liegt das IgA als Trimer oder Tetramer vor [48]. Wieland et al. konnten 2004 ggplgR charakterisieren, der funktionell dieselbe Aufgabe wie pIgR erfüllt [13].

IgA ist sowohl beim Menschen als auch beim Vogel zuständig für die Immunabwehr auf Schleimhäuten [48].

2.2.3 IgY

IgY ist der vorherrschende Antikörper im Serum von Vögeln, Reptilien und Amphibien [3]. Schon 1969 wurde die Bezeichnung „IgY“ vorgeschlagen [49]. Doch bis heute ist man sich in der Literatur uneinig, ob dieser Antikörper mit IgG oder IgY benannt wird. Ich werde im Folgenden den Namen „IgY“ verwenden, da meiner Meinung nach diese Bezeichnung klarer ist und zu weniger Verwechslung mit dem Säuger-IgG führt.

Die schwere Kette des IgY besteht aus fünf Domänen (V, C ν 1 – 4) [3]. Wobei bei der Ente auch ein kürzeres IgY vorhanden ist bei dem C ν 3 – 4 fehlen [3]. IgY hat mit dem Säuger-IgE und dem Säuger-IgG einen gemeinsamen Vorfahren. Strukturell gesehen ähnelt es sehr dem Säuger-IgE, dessen schwere Kette auch, wie die des

IgY, fünf Domänen besitzt [3]. Daneben besitzen Säuger-IgE und IgY die gleiche Anzahl an Disulfidbrücken innerhalb der einzelnen Domänen und zwischen den Ketten. C γ 2 – 3 des Säuger-IgG sind eng verwandt mit C ν 3 – 4 des IgY. Durch Kondensation der zweiten Domäne des IgY entstand die Gelenkregion des Säuger-IgG. Dadurch ist das IgG flexibler, aber auch instabiler [3].

IgG ist beim Säuger der vorherrschende Antikörper im Serum, es ist wichtig für die Oponisierung und Komplementaktivierung. Außerdem ist Säuger-IgG plazentagängig [50]. Das IgE des Säugers aktiviert Mastzellen und basophile Granulozyten, wobei es dann zum Auslösen von anaphylaktischen Reaktionen kommen kann. Des weiteren ist Säuger-IgE wichtig bei parasitären Infektionen [50]. Diese beiden Funktionen vereint IgY [3]. Zum einen ist IgY der Hauptantikörper im Serum bei Vögeln, Amphibien und Reptilien und wichtig für die Infektionsabwehr. Ferner kann IgY über die Dottersackmembran in den Embryo transportiert werden [4]. Aber IgY kann auch Mastzellen und basophile Granulozyten aktivieren, wobei anaphylaktische Reaktionen ausgelöst werden können [51].

Taylor et al. konnten 2009 die Kristallstruktur C ν 3 – 4 beschreiben [52]. Die Aminosäuren-Sequenz-Übereinstimmung zwischen den C $_H$ Domänen von IgY und Säuger-IgG beträgt nur 28 – 30 %, die von IgY und Säuger-IgE nur 31 %. Trotzdem besitzt die Quartärstruktur von C ν 3 – 4 die gleiche Hufeisen-ähnliche Form wie bei IgE und IgG [52]. Dies ist wiederum ein wichtiger Hinweis, dass IgY, Säuger-IgE und Säuger-IgG einen gemeinsamen Vorfahren aufweisen, der mindestens 300 Mio. Jahre zurückliegt. [52].

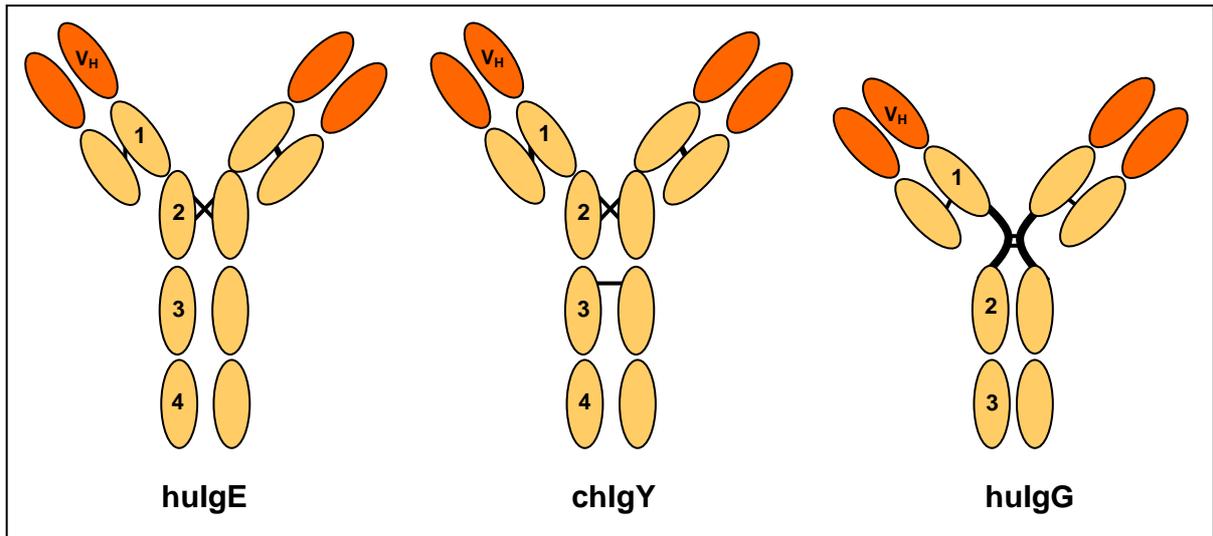


Abb. 8: Schematische Darstellung des humanen IgE / IgG und des IgY des Huhnes. Alle Ig sind aufgebaut aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Ferner besteht jede Kette aus einem konstanten und einem variablen Teil. In dieser Abbildung ist nur die schwere Kette beschriftet, die konstanten Domänen der schweren Ketten sind nummeriert.

3 Publikation

**A striking example of convergent evolution observed for the ggFcR : IgY interaction
closely resembling that of mammalian FcR : IgG**

Barbara Schreiner^a, Birgit C. Viertlboeck^a, and Thomas W. Göbel^a

^aInstitute for Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich,
Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Corresponding author:

Thomas W. Göbel

email: goebel@lmu.de

Tel.: ++49-89-2180-3827

Fax: ++49-89-2180-2554

Abstract

We have recently identified a novel IgY specific chicken FcR (ggFcR) on chromosome 20, a region where no FcR gene is present in mammals. Serially deleted IgY fusion proteins were tested in a reporter assay to identify C_H domains involved in ggFcR binding. Single C_H domains did not bind to ggFcR, whereas Fc ν 2 to Fc ν 4 induced good and the Fc ν 3 to Fc ν 4 domains moderate activity. When IgY from diverse birds were assayed, only IgY from gallinaceous birds showed binding, which enabled us to pinpoint several potential contact sites by a sequence comparison and molecular modelling. Point mutations of critical residues at these sites revealed the Fc ν 2 and Fc ν 3 domains as major ggFcR : IgY binding sites similar to mammalian IgG. These results demonstrate that ggFcR has a contact site to IgY which closely resembles that of human IgG bound to FcR

Keywords

Chicken, Fc receptor, Evolution, IgY

Abbreviations

LRC, leukocyte receptor complex; CHIR, chicken Ig-like receptor; FcR, Fc receptor; FcRL, Fc receptor-like

1. Introduction

Fc receptors (FcR) are expressed by a wide variety of leukocytes and participate in diverse effector functions such as phagocytosis, antibody dependent cytotoxicity and hypersensitivity (Nimmerjahn and Ravetch, 2008; Ravetch and Lanier, 2000). An expanded cluster of FcR genes found on human chromosome 1q21-23 and syntenic regions on mouse chromosomes 1 and 3 (Nimmerjahn and Ravetch, 2006) encode a total of eight human Fc γ R with different affinities to the human IgG subclasses, an Fc ϵ RI with high affinity to IgE as well as an Fc α/μ R specific for both IgA and IgM. Another group of receptors also encoded in this genomic cluster shares several structural features with FcR, but there is no evidence for binding to Ig, therefore these receptors are designated Fc receptor-like (FcRL) molecules (Davis, 2007). In some species, an additional FcR gene is found within the leukocyte receptor cluster (LRC) located on human chromosome 19q13.4, which resembles the Fc α R (CD89), specific for IgA. CD89 is structurally more related to LRC encoded proteins such as the killer inhibitory receptors and the leukocyte Ig-like receptors than to the FcR on chromosome 1 (Monteiro and Van De Winkel, 2003). The binding of CD89 to IgA takes place between the C α 2 and C α 3 domains, an interaction site that favours binding of two FcR to a single IgA from both sides. In contrast, the interaction site of the FcR encoded by the FcR gene cluster takes place close to the hinge region of IgG and the IgE C H 2/C H 3 domains, respectively. This shift of the binding site affects the interaction so that the FcR binds to Ig in a 1:1 stoichiometry (Woof and Burton, 2004).

All jawed vertebrates have the ability to mount antigen specific antibody responses and several Ig isotypes have been described from cartilaginous fish to mammals. Besides the highly conserved IgM, various isotypes such as IgY, IgD, IgNAR, IgA and IgX have been characterized (Flajnik, 2002). IgY that is present from amphibians to birds is believed to resemble an ancestral molecule of both IgG and IgE. It has four C H domains, no hinge region, and intrachain disulfides as observed in IgE, however, its amount, tissue distribution and transfer into eggs as maternal Ig are all IgG like features (Parvari et al., 1988; Warr et al., 1995). It has also been proposed that the Fc ν 2 domain of IgY has been condensed to form the mammalian hinge region (Parvari et al., 1988).

Despite the impressive data regarding non-mammalian Ig isotypes, the information about corresponding FcR in these animals has been very limited, although it is likely that a number of FcR exist in these species, especially since similar functional capabilities such as antibody mediated phagocytosis are present. Some proteins with clear homology to FcR have been described, however, they seem not to bind Ig (Guselnikov et al., 2008) and a soluble catfish

FcR that is specific for IgM has also been reported (Stafford et al., 2006), but to our knowledge no receptor binding to IgY has been identified in ectothermic vertebrates. In the chicken, at least three families of receptors with specificity for IgY are presently known. A receptor located in the chicken yolk sac is responsible for the transport of IgY to yolk, but structurally resembles a homologue to mammalian phospholipase A2 and functionally represents a homologue to the mammalian MHC-related neonatal FcR (West et al., 2004). The chicken LRC on chromosome 31 contains a large family of so called chicken Ig-like receptors (CHIR) that can be further subgrouped in activating, inhibitory and bifunctional subtypes (Viertlboeck et al., 2004; Viertlboeck and Göbel, 2011; Viertlboeck et al., 2005). We have characterized CHIR-AB1, a potentially bifunctional receptor, as an high affinity receptor for IgY (Viertlboeck et al., 2007) and successive studies have shown, that multiple copies of this receptor are encoded within the LRC (Lochner et al., 2010; Viertlboeck et al., 2009b). Recently, we identified a third IgY specific FcR on chicken chromosome 20, ggFcR, a receptor with four extracellular Ig domains and a transmembrane region containing a charged residue, that is important for the association of adapter molecules. ggFcR is expressed on blood cells including macrophages and thrombocytes and structurally shares several features with LRC encoded genes (Viertlboeck et al., 2009a). The present study was performed to characterize the IgY domains and residues that are important for binding to ggFcR, in order to compare this receptor to its chicken and mammalian counterparts.

2. Material and methods

2.1 Constructs and mutations

All constructs were made by PCR in the pSecTag/FRT/V5-His TOPO vector (Invitrogen) employing human IgG1 C γ 2 to C γ 3 and parts of the chicken IgY constant region. The generation of the constructs encoding chicken Fc ν 2 to 4, Fc ν 3 to 4 Fc ν 3 and Fc ν 4 has been described (Pürzel et al., 2009). For the generation of the Fc ν 2 fusion protein a stop codon was introduced at the end of the Fc ν 2 domain (Table 1). Similarly point mutations were introduced as described before with primers summarized in Table 1 (Pürzel et al., 2009).

2.2 Transient transfection

Transient transfection of HEK-293T cells were performed in 24 well tissue culture plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at a cell density of $4,3 \times 10^5$ cells per well and the liposomal transfection reagent Metafectene (Biontix, Martinsried/Planegg, Germany) according to the manufacturers instructions. Following an incubation period of 48 hours at 37°C in a medium consisting of RPMI 1640 with 10 % low IgG FBS (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) the supernatant was collected, centrifuged and stored at 4°C. For quantification of the fusion protein concentrations an ELISA system was used as described before (Viertlboeck et al., 2009b).

2.3 BWZ.36 reporter assay

The reporter assay was performed as described previously in a 24 well tissue culture plate (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) coated with 10 μ g/ml of a goat anti human IgG (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA) and different fusion proteins in identical concentrations (Pürzel et al., 2009; Viertlboeck et al., 2009a). Stably transfected ggFcR BWZ.36 cells (Viertlboeck et al., 2009a) at $1,5 \times 10^5$ cells per well were incubated on the coated plates at 37°C for 18 hours before cell lysis. Controls included chicken IgY (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK), the anti-FLAG mab M2 specific for the FLAG epitope (Sigma, Deisenhofen, Germany) that was introduced in the N-terminus of the ggFcR extracellular domain. Various preparations of egg yolk IgY from different birds were prepared according to standard methods (Kaspers et al., 1996). The β -galactosidase activity was measured using 130 μ l/well chlorophenolrot- β -D-galactopyranosid (CPRG, Roche, Mannheim, Germany) as substrate and quantified by optical density reading at 575 nm two hours after incubation. All assays were performed in duplicates and values of three to four independent assays were combined to calculate the mean \pm SD.

2.4 Molecular Modelling

The SWISS-MODEL workspace was used for molecular modelling in the automated mode (Arnold et al., 2006). For this purpose the amino acid sequence of the Fc γ 2 to Fc γ 3 domain were submitted for modelling. The model used was based on human IgE Fc ϵ 2 to Fc ϵ 4 domains (2wqr, B chain). The model was further modified in the Swiss Pdb Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>)(Guex and Peitsch, 1997).

3. Results

3.1 Fc ν 2 and Fc ν 3 IgY domains are involved in ggFcR interaction

A previously established BWZ.36 reporter cell line that expressed the extracellular ggFcR domain tagged with a FLAG epitope in combination with a cytoplasmic CD3 ζ tail was utilized to study the binding of ggFcR to a series of truncated IgY fusion proteins (Viertlboeck et al., 2009a). Binding of the extracellular domain induces the phosphorylation of the CD3 ζ cytoplasmic domain which then activates the β -galactosidase transcription through interaction with the NFAT promoter. Anti-FLAG stimulation and chicken IgY used as positive controls always induced high enzyme activity (Fig. 1). The single Fc ν 2, Fc ν 3 and Fc ν 4 domain containing fusion proteins were not able to stimulate the reporter cells (Fig. 1). In the presence of Fc ν 2 to Fc ν 4 domains, however, binding that was slightly lower compared to complete IgY molecule was detected (Fig. 1). The activity was further reduced with a Fc ν 3 to Fc ν 4 fusion protein. Since it was likely that the Fc ν 2 to Fc ν 3 domains would be important for the interaction we also made a construct encoding these two domains, however, even after several approaches this construct did not yield functional protein as tested by Western blot (data not shown) and could therefore not be tested. These results employing serially truncated IgY Fc regions indicate that the interaction site of IgY to ggFcR most likely includes residues located on at least two C_H domains.

3.2 ggFcR specificity is restricted to IgY from gallinaceous birds

IgY sequences have been described in a variety of bird species (Choi et al., 2010). In order to get additional information regarding the conservation of the IgY binding site, we next tested IgY preparations from various birds. Chicken, quail and turkey IgY induced very good binding activity, whereas pheasant IgY was somewhat weaker (Fig. 2). In contrast no activity could be determined when IgY from falcon, duck, parrot, and ostrich were employed (Fig. 2). The integrity of all IgY preparations was monitored by SDS-PAGE before the assay (data not shown). These results indicate that the IgY epitope responsible for binding to the ggFcR is only conserved in gallinaceous birds, but not in other bird species.

3.3 Sequence comparisons of IgY indicate potential ggFcR interaction sites

The binding results observed for IgY from different birds led us to compare the respective IgY sequences in more detail. It was of special interest to compare IgY sequences from gallinaceous birds that showed binding to ggFcR to the other IgY sequences that did not bind to ggFcR. Unfortunately, most of the IgY sequences of the non gallinaceous birds are not

available in the database, therefore we had to focus on duck IgY. Since chicken IgA is known to be unreactive with ggFcR (Viertlboeck et al., 2009a), we also included the IgA sequence in the analysis. We further limited the analysis to the Fc ν 2 and Fc ν 3 domains, since they may be most relevant for binding. Our strategy was to identify residues in these two domains that were conserved in all IgY sequences binding to ggFcR, but that were different in duck IgY and chicken IgA (Fig. 3, marked by arrows). These analyses identified eleven amino acids in Fc ν 2 and six amino acids in the Fc ν 3 domains, respectively.

3.4 Molecular modelling to predict potential ggFcR contact site

Since some of the residues appeared to be scattered over the domains, it was important to visualize in a structural model where these 17 residues are positioned, and if some of them lie in close vicinity so that they could form an interaction site for ggFcR.

For this purpose we employed molecular modelling of the chicken Fc ν 2 to Fc ν 4 domains.

The selection of the crystal structure used as a template to build the model was performed in an automated mode that employs sequence alignments with all proteins that have been deposited in the PDB database. When the Fc ν 2 and Fc ν 3 sequence were submitted, the model was calculated based on a human IgG1 crystal structure (PDB accession 1IGY, D chain), however, a submission of the Fc ν 2 to Fc ν 4 sequence yielded a model based on the respective human IgE domains that more closely match the IgY molecule with four C_H domains.

We next identified the 17 residues as space filling on the Ig domain structures. The first set of residues was located at the N-terminus of the Fc ν 2 domain pointing it the direction, where the Fc ν 1 and V domains would be present (Fig. 4, grey residues on the green Fc ν 2 domain).

Therefore, these residues are unlikely to form an interaction site together with residues of the Fc ν 3 domain. Similarly a second set of residues was located at a position that was in distance to the Fc ν 2 domain and was therefore unlikely to participate in creating a binding site to ggFcR (Fig. 4, grey residues on the yellow Fc ν 3 domain). A third group that mainly included C terminal residues of the Fc ν 2 domain (E316 to D335) and also the E437 residue of the Fc ν 3 domain seem to form a contact site located between the Fc ν 2 and Fc ν 3 domains (Fig. 3, marked by an asterix, Fig. 4, red residues). These residues were selected to perform alanine scanning mutagenesis.

3.5 Mutational analysis of selected IgY interaction sites

The residues identified above were successively mutated by point mutations into alanine (Fig. 3, marked by asterix, Fig. 4, coloured in red). In addition a previously reported mutation of N407 was included (Pürzel et al., 2009), since this conserved glycosylation site is known to be important for the interaction between IgG and FcR. All point mutations were induced at the construct encoding the Fc ν 2 to Fc ν 4 fusion protein in order to provide a direct comparison to the correct unmutated fusion protein. In addition, the integrity of every fusion protein was checked by Western blot before the assay (data not shown). Some mutations such as V332A, N407A, and E437A had a profound effect on the binding of the fusion protein to ggFcR, thus indicating that indeed residues from both domains took part in the creation of the ggFcR interaction site (Fig. 5). Other substitutions such as E316A, S319A, and E334A reduced the binding of the respective fusion protein to ggFcR. Finally, the D335A mutation had no effect (Fig. 5). In conclusion, residues from both the Fc ν 2 and Fc ν 3 domains are involved in the interaction to ggFcR.

4. Discussion

The ggFcR is located on a chromosomal region unrelated to the location to the FcR gene locus and the LRC, and it has no known orthologue in mammals (Viertlboeck et al., 2009a). Several features of ggFcR indicate a close relationship to LRC encoded genes such as their overall homology, structure and a split exon encoding the signal peptide that is a typical feature of LRC genes. This would indicate that the ggFcR originated by a gene duplication from the LRC. Therefore the present study was initiated to compare the contact sites of CHIR-AB1 and ggFcR to IgY with the hypothesis that the interaction sites would overlap given the close relationship of these two receptors.

The CHIR-AB1 interaction to IgY involves the two C-terminal IgY domains which favour a 2:1 receptor : IgY interaction (Arnon et al., 2008; Pürzel et al., 2009). However, the binding studies using serially deleted Fc ν fusion proteins immediately demonstrated that the contact sites of CHIR-AB1 and ggFcR to IgY are located on different Fc ν domains (Fig. 1). For CHIR-AB1, a fusion protein containing the Fc ν 3 and Fc ν 4 domains was sufficient to induce maximum binding as compared to IgY (Pürzel et al., 2009), whereas the similar fusion protein did induce only weak activity in the ggFcR binding assay.

All crystal structures of mammalian Ig bound to their respective FcR revealed two major interaction sites. One of them is formed by residues of the two C-terminal C α 2 and C α 3 domains and is similar to the binding site of CHIR-AB to IgY with many conserved amino acids. The second site present in IgE and IgG is formed by the C ϵ 2 and C ϵ 3 domains and the lower hinge and C γ 2 domain, respectively. The corresponding sites in IgY would resemble the Fc ν 2 and Fc ν 3 domains. Our attempts to produce these two isolated domains as fusion proteins failed, which may indicate that the N terminal Fc ν 1 and C terminal Fc ν 4 domains are essential for proper folding of the protein.

As a next step we identified amino acids by aligning IgY sequences from different birds and focused on 17 amino acids, which were further analyzed using molecular modelling on a human IgE crystal structure. IgY is close to both IgG and IgE (Taylor et al., 2009), but we favoured the IgE structure because IgY and IgE have four C_H domains and no hinge region. We concentrated on those residues that may form a binding site similar to the region in human IgE or IgG, which further diminished the number of relevant residues to six. In fact five of the six residues seem to play an important role in ggFcR binding as observed by reduced or lack of binding after mutations to alanine. Only the D335A mutation had no effect, which could be due to the position which points more upwards toward the Fc ν 2 domain. A seventh mutation tested involved a glycosylation site (N407A) that also reduced the binding to ggFcR. This

residue, conserved in all IgY and the some IgG sequences, is known to be essential for the interaction of IgG to FcR (Taylor et al., 2009) and the pronounced effect observed here emphasizes the similarities in the contact sites of IgG and IgY, however, the deletion of a glycosylation site can also severely affect the overall confirmation of the protein.

We demonstrate that the contact area of IgY to ggFcR is formed by several residues of the Fc ν 2 and Fc ν 3 domains, which closely resembles the interaction sites of FcR found on human IgE and IgG but clearly differs to CHIR-AB1 as well as the other chicken FcR described to date. The molecular identification of an IgY transporting FcR, similar in function to the neonatal FcRn, turned out to be related to the mammalian mannose receptor family (He and Bjorkman, 2011; West et al., 2004) and the recent cocrystallization predicted a 2 : 1 FcR : IgY interaction, where the receptor binds to the Fc ν 4 domain of IgY (He and Bjorkman, 2011). Finally, a chicken FcRL gene is found on a chromosomal area syntenic to the FcR gene cluster on human chromosome 1, but this receptor does not bind IgY and in contrast to the FcR cluster, resembles a single gene (Taylor et al., 2007). This is of special interest since there obviously was no expansion of this cluster in the chicken and the lack of Ig binding serves as an argument for the hypothesis that Ig reactivity may be a secondary specialization of FcR (Guselnikov et al., 2008). In contrast, the CHIR family including its CHIR-AB genes is subject to a birth-and-death mode of evolution that has been proposed for many immune-related genes (Nei and Rooney, 2005) and as a consequence there are multiple CHIR-AB copies within the LRC, that differ in IgY binding (Viertlboeck et al., 2010; Viertlboeck et al., 2007) closely reflecting the situation found in the mammalian FcR gene cluster with up to 25 FcR and FcRL genes.

The shift in the binding site observed for ggFcR and human FcR is associated with the transition from the LRC to distinct chromosomal locations, has further consequences such as a change from a 2:1 to a 1:1 receptor: ligand interaction and developed independently. It can only be speculated which mechanisms drove this transition occurring in the FcR of chickens and mammals. Similar to the situation proposed for IgA and the associated loss of CD89 in some mammals it can be hypothesized that selection pressure caused by pathogens is the driving force leading to the N-terminal transition of the FcR binding site (Abi-Rached et al., 2007; Parham, 2008). In conclusion, ggFcR although on an unique chromosomal location has a contact site to IgY which closely resembles that of human IgG bound to FcR, a striking example of convergent evolution.

Acknowledgements

We thank Dr. B. Kaspers for the gift of several IgY preparations. This work was supported by DFG grant GO489/3-7.

References

- Abi-Rached, L., Dorigi, K., Norman, P.J., Yawata, M., Parham, P., 2007. Episodes of natural selection shaped the interactions of IgA-Fc with Fc α RI and bacterial decoy proteins. *J. Immunol.* 178, 7943-7954.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Arnon, T.I., Kaiser, J.T., West, A.P., Jr., Olson, R., Diskin, R., Viertlboeck, B.C., Göbel, T.W., Bjorkman, P.J., 2008. The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 381, 1012-1024.
- Choi, J.W., Kim, J.K., Seo, H.W., Cho, B.W., Song, G., Han, J.Y., 2010. Molecular cloning and comparative analysis of immunoglobulin heavy chain genes from *Phasianus colchicus*, *Meleagris gallopavo*, and *Coturnix japonica*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 136, 248-256.
- Davis, R.S., 2007. Fc receptor-like molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 525-560.
- Flajnik, M.F., 2002. Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 688-698.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Gusel'nikov, S.V., Ramanayake, T., Erilova, A.Y., Mechetina, L.V., Najakshin, A.M., Robert, J., Taranin, A.V., 2008. The *Xenopus* FcR family demonstrates continually high diversification of paired receptors in vertebrate evolution. *BMC Evol. Biol.* 8, 48.
- He, Y., Bjorkman, P.J., 2011. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 12431-12436.
- Kaspers, B., Bondl, H., Göbel, T.W., 1996. Transfer of IgA from albumen into the yolk sac during embryonic development in the chicken. *Zentralbl Veterinarmed A* 43, 225-231.
- Lochner, K.M., Viertlboeck, B.C., Göbel, T.W., 2010. The red jungle fowl leukocyte receptor complex contains a large, highly diverse number of chicken immunoglobulin-like receptor (CHIR) genes. *Mol. Immunol.* 47, 1956-1962.
- Magor, K.E., Warr, G.W., Middleton, D., Wilson, M.R., Higgins, D.A., 1992. Structural relationship between the two IgY of the duck, *Anas platyrhynchos*: molecular genetic evidence. *J. Immunol.* 149, 2627-2633.
- Monteiro, R.C., Van De Winkel, J.G., 2003. IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 177-204.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* 39, 121-152.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2006. Fc γ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19-28.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2008. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34-47.
- Parham, P., 2008. The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. *Semin. Immunol.* 20, 311-316.
- Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Tel-Or, S., Burstein, Y., Schechter, I., 1988. Chicken immunoglobulin gamma-heavy chains: limited VH gene repertoire, combinatorial diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *Embo J.* 7, 739-744.
- Pürzel, J., Schmitt, R., Viertlboeck, B.C., Göbel, T.W., 2009. Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc α RI interaction. *J. Immunol.* 183, 4554-4559.
- Ravetch, J.V., Lanier, L.L., 2000. Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84-89.

- Stafford, J.L., Wilson, M., Nayak, D., Quiniou, S.M., Clem, L.W., Miller, N.W., Bengten, E., 2006. Identification and characterization of a FcR homolog in an ectothermic vertebrate, the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Immunol.* 177, 2505-2517.
- Taylor, A.I., Fabiane, S.M., Sutton, B.J., Calvert, R.A., 2009. The crystal structure of an avian IgY-Fc fragment reveals conservation with both mammalian IgG and IgE. *Biochemistry* 48, 558-562.
- Taylor, A.I., Gould, H.J., Sutton, B.J., Calvert, R.A., 2007. The first avian Ig-like Fc receptor family member combines features of mammalian FcR and FCRL. *Immunogenet.* 59, 323-328.
- Viertlboeck, B.C., Crooijmans, R.P., Groenen, M.A., Göbel, T.W., 2004. Chicken Ig-Like Receptor B2, a Member of a Multigene Family, Is Mainly Expressed on B Lymphocytes, Recruits Both Src Homology 2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and Inhibits Proliferation. *J. Immunol.* 173, 7385-7393.
- Viertlboeck, B.C., Gick, C.M., Schmitt, R., Du Pasquier, L., Göbel, T.W., 2010. Complexity of expressed CHIR genes. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 866-873.
- Viertlboeck, B.C., Göbel, T.W., 2011. The chicken leukocyte receptor cluster. *Vet. Immunol. Immunopathol.* doi:10.1016/j.vetimm.2011.07.001.
- Viertlboeck, B.C., Habermann, F.A., Schmitt, R., Groenen, M.A., Du Pasquier, L., Göbel, T.W., 2005. The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *J. Immunol.* 175, 385-393.
- Viertlboeck, B.C., Schmitt, R., Hanczaruk, M.A., Crooijmans, R.P., Groenen, M.A., Göbel, T.W., 2009a. 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., Schweinsberg, S., Hanczaruk, M.A., Schmitt, R., Du Pasquier, L., Herberg, F.W., Göbel, T.W., 2007. The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 11718-11723.
- Viertlboeck, B.C., Schweinsberg, S., Schmitt, R., Herberg, F.W., Göbel, T.W., 2009b. The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors. *J. Immunol.* 182, 6985-6992.
- Warr, G.W., Magor, K.E., Higgins, D.A., 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 16, 392-398.
- West, A.P., Jr., Herr, A.B., Bjorkman, P.J., 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.
- Woof, J.M., Burton, D.R., 2004. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 89-99.

Figure legends

Fig. 1. Binding activity of serially deleted Fc ν fusion proteins.

A reporter assay using the murine cell line BWZ.36 stably transfected with a construct encoding the extracellular ggFcR tagged with a FLAG epitope was employed to test for the binding of serially deleted Fc ν fusion proteins to ggFcR and compared to the controls of either egg yolk IgY or anti-FLAG mab. Mean \pm SD of four independent assays is shown.

Fig. 2. Reactivity of IgY from different birds.

IgY isolated from egg yolk from the birds as indicated was tested in the binding assay and compared to chicken IgY. Mean \pm SD of three independent assays is shown.

Fig. 3. Sequence alignment of Fc ν 2 and Fc ν 3 domains.

The different sequences of the Fc ν 2 and Fc ν 3 domains were aligned using ClustalW. The amino acid sequence of quail, pheasant and turkey was taken from (Choi et al., 2010) due to the lack of a database entry. The accession number for chicken and duck IgY are S00390 and B46529, respectively (Magor et al., 1992; Parvari et al., 1988). Arrows indicate residues conserved in IgY of gallinaceous birds, but not duck IgY or chicken IgA, a asterix indicates residues used for mutational studies.

Fig. 4. Molecular modelling of Fc ν 2 to Fc ν 4 domains.

The ribbon model involves the Fc ν 2 (green), Fc ν 3 (yellow) and Fc ν 4 (blue) domains with those residues as identified by sequence alignments shown as space filling (arrows in Fig. 3) and are colour coded with red and grey for residues that were and were not included in mutational analyses, respectively.

Fig. 5. Mutational analysis of selected Fc ν 2 and Fc ν 3 residues.

Selected residues most likely participating in the ggFcR interaction were mutated to alanine. Wild type Fc ν 2 to F ν 4 fusion proteins were compared to the fusion proteins containing single mutations. Mean \pm SD of three independent assays is shown.

Table 1. Primer sequences

Name	Sequence	Specificity
1452 s	CAAGGGATGCCCGT G ACGGCGCTCAGAG	Fcγ 2-3 + Fcν 2
1453 as	CTCTGAGCGCCGT C ACGGGCATCCCTTG	Fcγ 2-3 + Fcν 2
1343 s	CCTCCAAGAACA C TT C GCCGGCACCTACAGCGCC	N 407 A
1344 as	GGCGCTGTAGGTGCC G GCGAAGTGTTCTTGGAGG	N 407 A
1557 s	TGCAGCACGAG G CGCTGCCCTG	E 437 A
1558 as	GCAG C GCCTCGTGCTGCACGGTGCAG	E 437 A
1575 s	CAACACCGTGGT G G C AGATCACGTCAAG	E 334 A
1576 as	CTTGACGTGATCT G CCACCACGGTGTG	E 334 A
1577 s	GCAACCAACAC C G C GGTGAAGATCACG	V 332 A
1578 as	CGTGATCTTCCAC C G C GGTGTGGTTGC	V 332 A
1581 s	GTGGTGAAG C TCACGTCAAGGGATG	D 335 A
1582 as	TGACGTG A GCTTCCACCACGGTGTG	D 335 A
1583 s	GGAG G CAGGGAAAAGTTACAGCTGTAGG	E 316 A
1584 as	TTCC T GCCCTCCAATCGGTGCCGCTGAC	E 316 A
1585 s	AAGGGAA A G C TTACAGCTGTAGGGTGAGG	S 319 A
1586 as	AGCTGTA A G C TTTCCCTTCCCTCCAATC	S 319 A

Fig.1

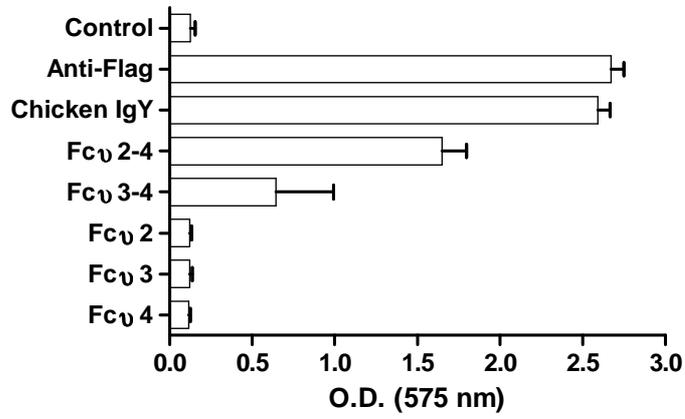


Fig.2

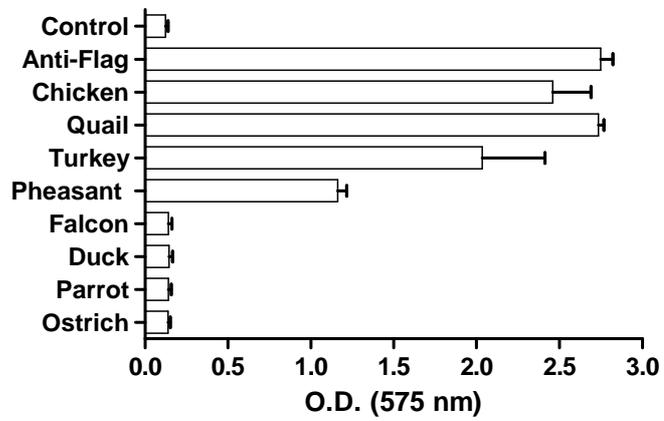


Fig.3

Fc α 2

Chicken	VCRVDPVPPVAPEVQVLHASSCTPSQSESVELLCLVTGFSPASAEVEWLV DGVGG- - L
Quail	ACLGSSLTPLAPEVQLVHSSSCSPSNRETVELI CLVTGFSPPELQI DWLI DGRKAGPT
Turkey	VCRVSPTPPSAPEV-VLHGSSCAASRGGSVELLCLVTGFSPAQI ELEWLV DGI RG- - L
Pheasant	VCRVPPTPYSAPEVQVLHASSCTASSGDSVELLCLVTGFSPAQL ELEWLV DGMRG- - L
Duck	- GCVAGGEPTPPEVQVLHSSVCSTLGD DSVELL CVI TGFSPPPVEVEWLV DGA- - H
Chicken IgA	TI GGDGVCP I FTSKVTLLSDPTQEDPERRVLLVCLVEGLPSAGAAI QWLQDNEEMT- P

Chicken	LVASQSPAVRSG- - STYSLSSRVNVS GT DWREGKSYS CRVRHPATNT VVEDHV KGC PD
Quail	FPAI RGPMVRE EGE STYSVTSRVNVSKS DWSEGKSFT CQVKHPGTGS VVEDHV RGC EG
Turkey	LVASDSPVVREG- - STYSFSSRL NVSKDDWKEGKSFT CRVKHPGTAT VVEDHARACSG
Pheasant	VVASNTPVVREG- - STYSFSSRL NVSKEDWKEGKS YTCRVKHPGTST VVEDHARACSS
Duck	LVATMTRPQREAGSKTYMAT SQT NVSREDWKAGK AFTCRVKHPATGGTAQGHARFC PG
Chicken IgA	APESDES GCSDCTESGVTQWSRVNVTRKSWEGGAQFGCRVTHG- - - AVKEPVTATVS

Fc α 3

Chicken	G- AQSCSPI QLYAI PPSPGELYI S L DAKLRCLVVNLPSDSSLSVTWTREK- SGNLRPD
Quail	S- TQTCGPI QV FLL PPSPGDLYI GLDAKI RCLVYNLPSKASLSI TWSRDKQHGH LRPD
Turkey	P- TQSCSPI QVYAI PPSPGELYI GLDAKLKCLVVNLPSDSSLSL TWTREK- SGALRPD
Pheasant	T- PHSCSPI QLYAI PPSPGELYI GLDAKLKCLVV- FSQRFQPQPHWDQEK- SGI FL PD
Duck	SGAQSCSPI QI FVVPPSPGSLYI RQDAKVHCLVVNLPSDASLSI SWTREK- SGALRPD
Chicken IgA	TDCDATPQL QV SLL PPTLEEL LVSHNATVT CVVSNAAAADGVSVSWSRSS- - GGGL DV

Chicken	PMVLQE HFN GTYSASSA V P V S T Q D W L S G E R F T C T V Q H E E L P L P L S K S V Y R N T
Quail	P L I L Q E H Y N G T Y S A S S S V P I S T Q D W L A G E R F S C T V Q H D E L P Q P V V K G I K K E T
Turkey	P M V L Q E H F N G T Y S A S S A V P I S T Q D W L A G E R F T D T V Q H E E L P L P L S R S V Y R H T
Pheasant	P R F F Q E H F N G T Y S A S S S V P I S T Q D W L A G E S F T C T V Q H E E L P L P L T R S V Y R H P
Duck	P M V L T E H F N G T F T A S S S L A I S T Q D W L A G E R F T C T V Q H E D L P V P L G K S I A K H A
Chicken IgA	S Q T E D R Q A D G R Y T V R S F L R V C A E E W N G G E T F G C S V R E E G V V V A E E S I R K E T D

Fig.4

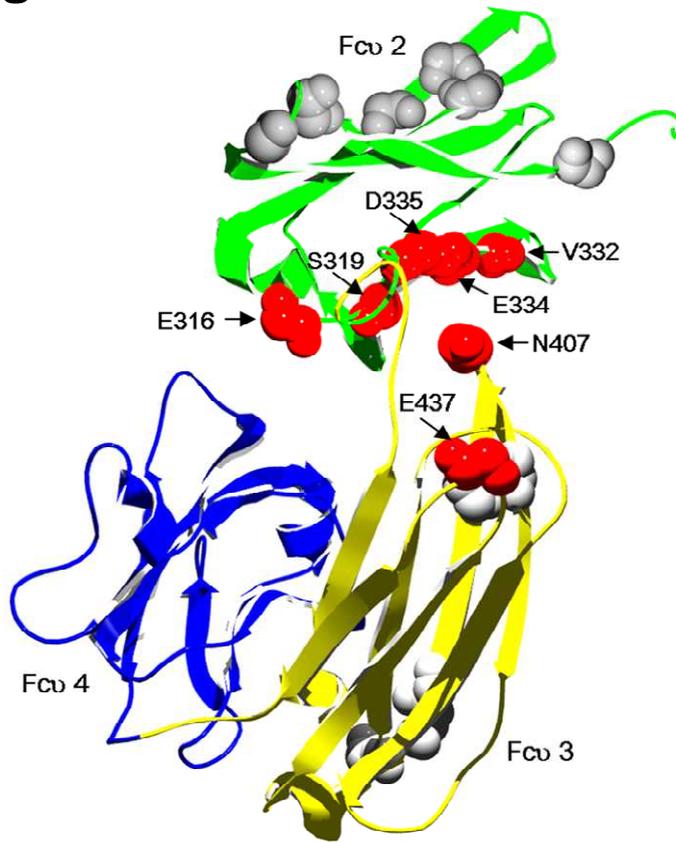
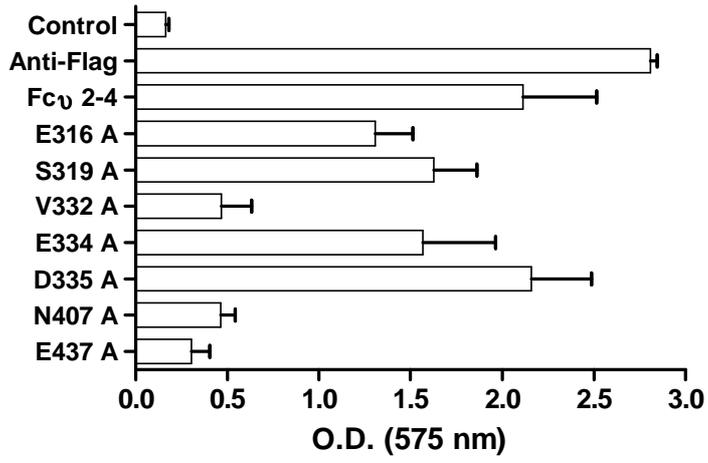


Fig.5



4 Diskussion

FcR gehören zur Familie der Ig ähnlichen Immunorezeptoren, deren Aufgabe es ist, Antigene zu erkennen [7]. Dabei erkennen FcR Antigene nicht direkt, sondern Antigen-Antikörper-Komplexe, indem sie den Fc-Teil des Antikörpers binden [8]. Man unterscheidet hemmende und aktivierende FcR, die auch gleichzeitig auf einer Zelle vorkommen. Dadurch wird die Immunantwort der Zelle in Balance gehalten [10]. Beim Menschen liegt der FcR Locus auf Chromosom 1, wo auch die FcR/L Gene zu finden sind. FcR/L sind Rezeptoren, die keine Ig binden können, obwohl sie hohe Sequenzhomologie mit den FcR aufweisen.

Ein weiterer humaner FcR ist der Fc α RI (= CD89), dessen Gen im LRC auf Chromosom 19 liegt. Fc α RI ist näher verwandt mit Rezeptoren des LRC als mit klassischen FcR [7]. Man vermutet, dass sich der FcR Locus ursprünglich auf Chromosom 19 befand. Einige der FcR (humaner Fc α RI, boviner Fc γ 2R, aviärer CHIR-AB1) befinden sich noch heute im LRC. Beim Menschen kam es dann wahrscheinlich zu einer Genduplikation mit anschließender Verlagerung der klassischen FcR von Chromosom 19 auf Chromosom 1 [35]. Durch diese Verschiebung der Gene auf ein anderes Chromosom änderten sich die Bindungsstelle an die jeweiligen Ig und die Bindungsstöchiometrie. So verschob sich die Bindungsstelle für das humane IgG und IgE von den beiden distalen Fc Domänen zur unteren Gelenkregion des IgG bzw. zur Fc ϵ 2/ Fc ϵ 3 Domäne. Infolgedessen veränderte sich auch die Bindungsstöchiometrie des FcR zu seinem Ig von 2:1 zu 1:1.

Beim Huhn liegt auf Chromosom 25, der syntenischen Region des humanen FcR Locus (Chromosom 1), nur ein FcR/L Gen. Diesen chFcR/L konnten Taylor et al. 2007 charakterisieren [44]. Das Fehlen von weiteren FcR und FcR/L Genen auf dem Chromosom 25 des Huhnes deutet darauf hin, dass weitere Vertreter der klassischen FcR und FcR/L beim Menschen erst nach Auftrennung von Säugetier und Vogel durch Genduplikationen entstanden sind [44].

Ein weiterer FcR beim Huhn, der IgY hoch affin bindet, ist CHIR-AB1 [5]. Das CHIR-AB1 Gen befindet sich im LRC des Huhnes auf Chromosom 31. CHIR-AB1 ist enger verwandt mit dem humanen Fc α RI und dem bovinen Fc γ 2R als mit klassischen FcR. Folglich ist es nicht verwunderlich, dass die CHIR-AB1:IgY Interaktion der Fc α RI:IgA

Interaktion gleicht. Beide Rezeptoren binden mit der Domäne 1 an eine Bindungsstelle des jeweiligen Ig, die von C_H2 und C_H3 einer schweren Kette gebildet wird [35]. Es entsteht eine Bindungsstöchiometrie von 2:1.

Viertböck et al. konnten 2009 einen weiteren FcR beim Huhn beschreiben, den ggFcR [6]. Dieser Rezeptor hat einige Merkmale, die auf eine nahe Verwandtschaft zu Rezeptoren des LRC schließen lassen [6]. Das Signalpeptid des ggFcR wird zum Beispiel von zwei Exons kodiert, wobei das Zweite 36 Basenpaare lang ist. Dies ist charakteristisch für Gene des LRC [6]. Überdies findet man in der transmembranen Region ein NxxR Motiv, welches spezifisch für Gene des LRC ist [38]. Das Gen für ggFcR liegt aber nicht, wie zu erwarten wäre, im LRC, sondern auf Chromosom 20 des Huhnes. In der zum Hühner-Chromosom 20 syntenischen Region des Menschen findet man kein Gen für einen Ig ähnlichen Rezeptor [6]. Darum liegt die Vermutung nahe, dass das Gen für ggFcR durch Gen-Vervielfältigung im LRC entstanden ist und dann auf das Chromosom 20 verschoben wurde.

Durch die enge Verwandtschaft von ggFcR zu CHIR-AB1 könnte man annehmen, dass sich die IgY-Bindungsstelle von ggFcR mit der von CHIR-AB1 deckt. Das ist jedoch nicht der Fall. Aufgrund dieser Dissertation konnte durch Mutationsanalysen am IgY gezeigt werden, dass für die Bindung von ggFcR:IgY sowohl Aminosäuren der Fc ν 2 als auch der Fc ν 3 des IgY von Bedeutung sind. Bei Mutationen von Valin 332 (V332), Glutamin 403 (Q403), Serin 411 (S411) und Glutaminsäure 437 (E437) zu Alanin kann ggFcR nicht mehr an IgY binden. Bei Mutationen von Glutaminsäure 316 (E316), Serin 319 (S319) und Glutaminsäure 334 (E334) zu Alanin kann ggFcR nur noch eingeschränkt an IgY binden. Diese Aminosäuren liegen in C_H2 und C_H3 der schweren Kette des IgY. Die Interaktion von ggFcR mit IgY ähnelt damit mehr der Interaktion Fc γ R:IgG des Säugers.

Überdies kann bei einer Mutation von Asparagin 407 (N407) zu Alanin keine Bindung zwischen ggFcR und IgY aufgebaut werden. N407 ist im aviären IgY und im Säuger IgG konserviert und ist beim Säuger essentiell für die Bindung von IgG zu Fc γ R, da N407 eine wichtige Glykosilierungsstelle bildet. Durch Mutation dieser Aminosäure kann es durchaus zu einer Konformationsänderung des gesamten Proteins kommen, was die Bindung direkt beeinflussen würde.

Um weitere Erkenntnisse über das Bindungsverhalten von ggFcR und auch von CHIR-AB1 zu erlangen, habe ich in meiner Studie geprüft, ob Mutationen der Aminosäuren, die bei ggFcR essentiell für die Bindung an IgY sind, auch einen

Diskussion

Einfluss auf die Bindung zwischen CHIR-AB1 und IgY aufweisen. Pürzel et al. konnten zeigen, dass die Aminosäuren Tyrosin (Y363), Isoleucin (I364), Histidin (H550) und Arginin (R556) obligatorisch für die Bindung von IgY zu CHIR-AB1 sind [35]. Gegenwärtig kann ich belegen, dass die Mutationen von V332, Q403 und S411 zu Alanin die Interaktion zwischen CHIR-AB1 und IgY nicht beeinflussen.

Interessanterweise kann CHIR-AB1 jedoch bei einer Mutation von E437 zu Alanin nicht mehr an IgY binden. Die Mutation von E437 im IgY beeinflusst auch bei ggFcR die Bindung direkt. E437 liegt aber in der Fc ν 3 und in unmittelbarer Nähe zur Fc ν 2. Diese Stelle ist für die Bindung von CHIR-AB1 zu IgY nicht von Bedeutung. Es wäre daher möglich, dass sich durch diese Mutation die Konformation des vollständigen Moleküls verändert.

E437 liegt außerdem im Molekularmodell von IgY Fc ν 2 – 4 nahe am Cystein 340 (C340). C340 baut eine Disulfidbrücke zur zweiten schweren Kette des IgY auf. Durch Mutation von E437 könnte auch diese Disulfidbrücke und infolgedessen die gesamte Struktur des IgY beeinflusst werden.

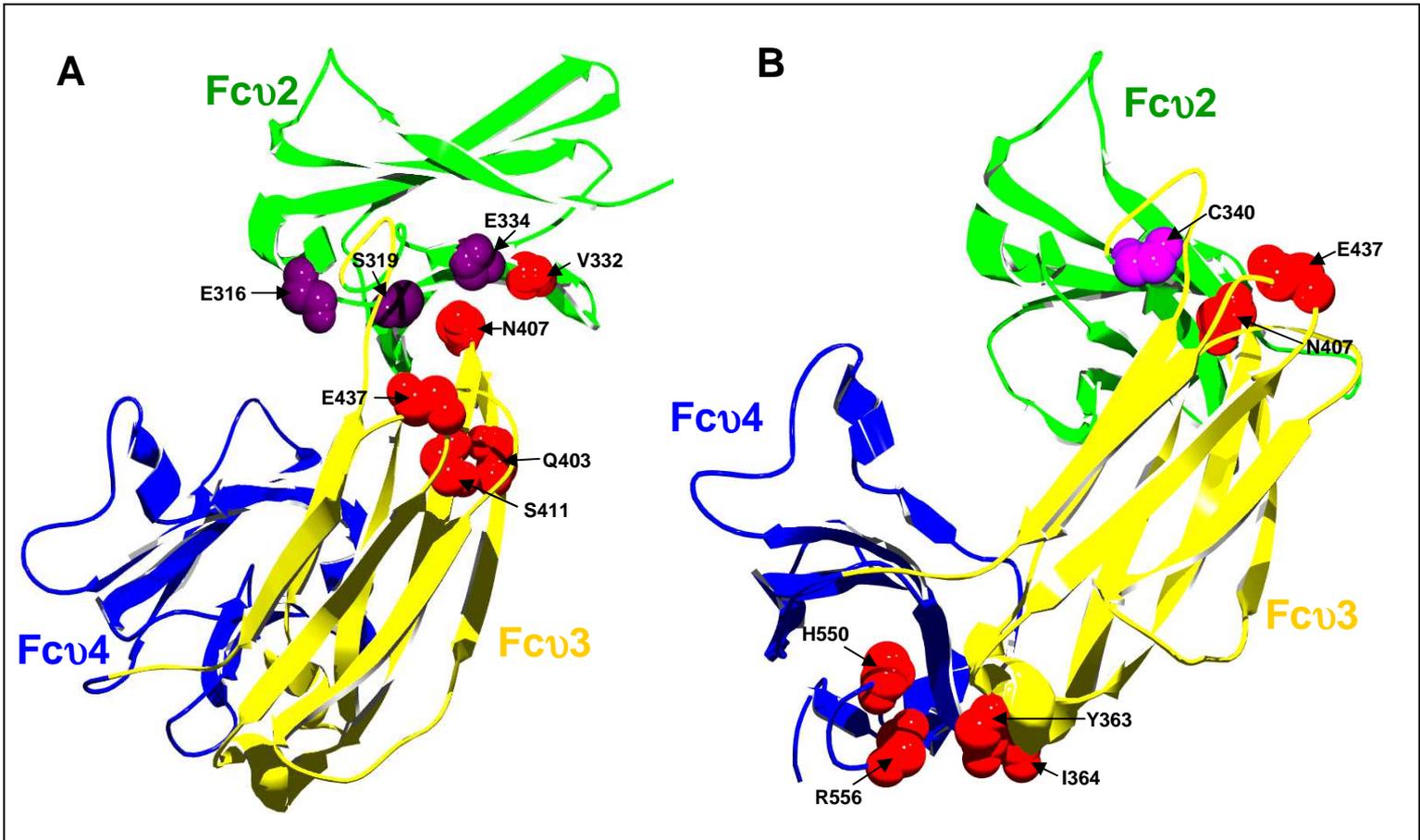


Abb. 9: Modell des IgY Fc γ 2 – 4.

Dieses Modell wurde mit Hilfe von SWISS-MODEL hergestellt. Als Vorlage dienen die Domänen Fc ϵ 2 – Fc ϵ 3 des humanen IgE. Modifizierungen wurden unter Verwendung von Swiss Pdb Viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) angefertigt. Abb. 9A: Aminosäuren, die für die Bindung an ggFcR essentiell sind, sind rot eingezeichnet, Aminosäuren mit schwachem Effekt auf die Bindung sind lila eingezeichnet.

Abb. 9B: Essentielle Aminosäuren für die Bindung an CHIR-AB1 sind rot, Cystein 340 ist pink eingezeichnet, zur besseren Übersicht wurde das IgY Modell gedreht.

Abschließend muss betont werden, dass sich durch derartige Mutationen die Konformation des vollständigen Moleküls verändern kann. Deshalb kann endgültige Klarheit nur durch eine Kristallstruktur des ggFcR-IgY-Komplexes erlangt werden. Dies scheint aber zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchführbar, da selbst das vollständige IgY-Molekül noch nicht kristallisiert werden konnte [52].

Diskussion

Ziel dieser Studie war es, ggFcR, einen kürzlich charakterisierten FcR beim Huhn, und dessen Bindungsverhalten eingehend zu erforschen. Durch Mutationsanalysen konnte festgestellt werden, dass die Bindungsstelle für ggFcR am IgY von Fc ν 2 und Fc ν 3 gebildet wird. Dies ist verwunderlich, da ggFcR große Ähnlichkeit mit CHIR-AB1 aufweist. Wahrscheinlich hat sich diese Bindungsstelle erst bei der Verlagerung des Gens vom LRC auf Chromosom 20 entwickelt.

Ein weiterer Ansatz um die Interaktion von ggFcR:IgY und deren Ähnlichkeit zur Interaktion von Fc γ R:IgG zu erklären, wäre die Theorie der konvergenten Evolution. Die ähnlichen Bindungseigenschaften von ggFcR:IgY und Fc γ R:IgG könnten durch Anpassung an eine ähnliche Umwelt entstanden sein. So können sich ähnliche Eigenschaften in völlig unterschiedlichen Spezies ausbilden.

5 Zusammenfassung

Mutationsstudien der Interaktion zwischen IgY und ggFcR

Ein kürzlich neu beschriebener FcR beim Huhn (ggFcR) bindet mit niedriger Affinität Hühner IgY, aber kein Hühner-IgA und -IgM. Obwohl das Gen für ggFcR eng verwandt mit Genen aus dem LRC auf Mikrochromosom 31 ist, liegt es überraschenderweise auf Chromosom 20 des Huhnes. Auf der syntenischen Region zum Chromosom 20 des Huhnes findet man beim Menschen kein Gen für einen Ig ähnlichen Rezeptor.

In dieser Studie wurden die Bindungseigenschaften des Rezeptors ggFcR und seinem Liganden IgY mit Hilfe von β -Galaktosidase-Bindungsassays näher charakterisiert. Anfänglich wurden rekombinante Proteine eingesetzt, in denen die humanen C γ 2- und C γ 3-Domänen mit verschiedenen C ν -Domänen des IgY assoziiert waren. So konnte belegt werden, dass außer vollständigem Hühner-IgY auch rekombinante Proteine, die Fc ν 2 – 4 Domänen enthalten, gut binden. Fc ν 3 – 4 zeigte kaum mehr Bindungsfähigkeit und die einzelnen Domänen Fc ν 2, Fc ν 3 und Fc ν 4 konnten nicht mehr mit ggFcR interagieren.

Daraufhin wurde die Interaktion von IgY verschiedener Spezies mit ggFcR getestet. Der Rezeptor zeigte starke Bindung an IgY der Galliformes (Huhn, Wachtel, Pute, Fasan), während bei IgY von Falke, Papagei, Strauss und Ente keine Interaktion mit ggFcR nachgewiesen werden konnte.

Angesichts dieser Ergebnisse wurden Aminosäuresequenzen der Domänen Fc ν 2 und Fc ν 3 der IgY der Galliformes mit dem IgY der Ente und dem IgA des Huhnes verglichen. Alle Aminosäuren, die in den Sequenzen der Galliformes konserviert sind, *nicht* aber in Sequenzen von Ente und Hühner-IgA, wurden ausgewählt und in einem dreidimensionalen Strukturmodell von IgY Fc ν 2 – 4 identifiziert. Aufgrund dieses Modells wurden die Aminosäuren ausgewählt, die wichtig für die Rezeptor-Ligand-Bindung sein könnten und anschließend zu Alanin mutiert. Mit Hilfe dieser Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass sowohl Aminosäuren der Fc ν 2 als auch der Fc ν 3 essentiell für die Bindung von IgY an ggFcR sind. Dieses Bindungsverhalten ähnelt dem des Säuger-IgG an Fc γ R und gibt weitere Aufschlüsse über die Phylogenie der FcR.

6 Summary

Mutational studies of the interaction between IgY and ggFcR

A new chicken FcR, designated ggFcR, was identified recently as a low affinity FcR, which binds selectively IgY, but neither chicken IgA nor chicken IgM. Surprisingly the ggFcR gene is encoded on chromosome 20, although it is highly related to LRC genes. The human chromosome 20 is syntenic to chicken chromosome 20, but does not include any Ig like receptor genes.

In this study we determined the interaction site between ggFcR and IgY with β -galactosidase-reporter-assays.

Initially, recombinant IgY fusion proteins, in which human C γ 2- and C γ 3-domains were linked to different C ν -domains were tested in the reporter assay. With this approach C_H domains critical for ggFcR binding were identified. Fc ν 2 – 4 generated good and Fc ν 3 – 4 moderate binding activity, whereas single C_H domains did not bind to ggFcR at all.

In a next step IgY from diverse birds were assayed. GgFcR could bind to IgY from gallinaceous birds (chicken, quail, turkey, pheasant), but showed no interaction to IgY from falcon, duck, parrot and ostrich.

Considering these facts we compared the sequences of Fc ν 2 and Fc ν 3 of gallinaceous birds with sequences of duck IgY and chicken IgA. We chose all residues which were conserved in gallinaceous birds but not in duck and chicken IgA and identified their location in the Fc ν 2 – 4 molecular model. This enabled us to pinpoint some likely contact sites and mutate them into alanin.

These mutation analyses revealed that residues within the Fc ν 2 and Fc ν 3 domain compose the binding site for ggFcR. This indicates that ggFcR has a contact site to IgY which is closely similar to that of human IgG bound to FcR.

7 Literaturverzeichnis

1. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
2. Flajnik, M.F., *Comparative analyses of immunoglobulin genes: surprises and portents*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 688-98.
3. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunol Today, 1995. **16**(8): p. 392-8.
4. 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**(5): p. 601-10.
5. Viertelboeck, 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.
6. Viertelboeck, 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*. J Immunol, 2009. **182**(3): p. 1533-40.
7. Monteiro, R.C. and J.G. Van De Winkel, *IgA Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 177-204.
8. Daeron, M., *Fc receptor biology*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 203-34.
9. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 275-90.
10. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors: old friends and new family members*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 19-28.
11. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Antibody-mediated modulation of immune responses*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 265-75.
12. Woof, J.M., Burton, D.R., *Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures*. Nat.Rev.Immunol. 4, 2004.
13. Wieland, W.H., et al., *A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (Gallus gallus) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 3): p. 669-76.
14. Ravetch, J.V. and J.P. Kinet, *Fc receptors*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 457-92.
15. Unkeless, J.C., E. Scigliano, and V.H. Freedman, *Structure and function of human and murine receptors for IgG*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 251-81.
16. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc-receptors as regulators of immunity*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 179-204.
17. Ono, M., et al., *Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling*. Cell, 1997. **90**(2): p. 293-301.
18. Pearce, R.N., et al., *SHIP recruitment attenuates Fc γ₁RIIB-induced B cell apoptosis*. Immunity, 1999. **10**(6): p. 753-60.
19. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway's Immunobiology*. 2008, Garland Science
20. Morton, H.C., et al., *Identification of residues within the extracellular domain 1 of bovine Fc γ₂R essential for binding bovine IgG2*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47794-800.

21. Pleass, R.J., et al., *Streptococcal IgA-binding proteins bind in the Calpha 2-Calpha 3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8197-204.
22. Roopenian, D.C. and S. Akilesh, *FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 715-25.
23. Jones, E.A. and T.A. Waldmann, *The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat*. J Clin Invest, 1972. **51**(11): p. 2916-27.
24. Tesar, D.B., E.J. Cheung, and P.J. Bjorkman, *The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(4): p. 1587-93.
25. Simister, N.E. and K.E. Mostov, *An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens*. Nature, 1989. **337**(6203): p. 184-7.
26. Linden, C.D. and T.F. Roth, *IgG receptors on foetal chick yolk sac*. J Cell Sci, 1978. **33**: p. 317-28.
27. He, Y. and P.J. Bjorkman, *Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12431-6.
28. 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.
29. Wende, H., et al., *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4*. Mamm Genome, 1999. **10**(2): p. 154-60.
30. Martin, A.M., et al., *Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men*. Trends Immunol, 2002. **23**(2): p. 81-8.
31. Kelley, J., L. Walter, and J. Trowsdale, *Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters*. PLoS Genet, 2005. **1**(2): p. 129-39.
32. Viertlboeck, B.C. and T.W. Gobel, *The chicken leukocyte receptor cluster*. Vet Immunol Immunopathol, 2011.
33. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6985-92.
34. 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.
35. Purzel, J., et al., *Chicken IgY binds its receptor at the CH3/CH4 interface similarly as the human IgA: Fc alpha RI interaction*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4554-9.
36. 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, 2010. **34**(2): p. 97-101.
37. Arnon, T.I., et al., *The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor*. J Mol Biol, 2008. **381**(4): p. 1012-24.
38. Guselnikov, S.V., et al., *The Xenopus FcR family demonstrates continually high diversification of paired receptors in vertebrate evolution*. BMC Evol Biol, 2008. **8**: p. 148.
39. Johansen, F.E., R. Braathen, and P. Brandtzaeg, *Role of J chain in secretory immunoglobulin formation*. Scand J Immunol, 2000. **52**(3): p. 240-8.
40. Frutiger, S., et al., *The amino-terminal domain of rabbit secretory component is responsible for noncovalent binding to immunoglobulin A dimers*. J Biol Chem, 1986. **261**(35): p. 16673-81.

41. Mansikka, A., *Chicken IgA H chains. Implications concerning the evolution of H chain genes.* J Immunol, 1992. **149**(3): p. 855-61.
42. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition.* Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 381-405.
43. Maltais, L.J., et al., *New nomenclature for Fc receptor-like molecules.* Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 431-2.
44. Taylor, A.I., et al., *The first avian Ig-like Fc receptor family member combines features of mammalian FcR and FCRL.* Immunogenetics, 2007. **59**(4): p. 323-8.
45. Waltari, E. and S.V. Edwards, *Evolutionary dynamics of intron size, genome size, and physiological correlates in archosaurs.* Am Nat, 2002. **160**(5): p. 539-52.
46. Fayngerts, S.A., A.M. Najakshin, and A.V. Taranin, *Species-specific evolution of the FcR family in endothermic vertebrates.* Immunogenetics, 2007. **59**(6): p. 493-506.
47. Schreeder, D.M., et al., *Cutting edge: FcR-like 6 is an MHC class II receptor.* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 23-7.
48. Davison, F., B. Kaspers, and K.A. Schart, *Avian Immunology.* 2008: Academic Press.
49. Leslie, G.A. and L.W. Clem, *Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken.* J Exp Med, 1969. **130**(6): p. 1337-52.
50. Taylor, A.I., et al., *Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure.* J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16384-90.
51. Faith, R.E. and L.W. Clem, *Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population.* Immunology, 1973. **25**(1): p. 151-64.
52. 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**(3): p. 558-62.

8 Persönliche Daten

Name: Barbara Schreiner
Geburtsdatum: 07.03.1983
Geburtsort: Mallersdorf-Pfaffenberg

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Göbel für die Überlassung des Themas und seine hervorragende fachliche Betreuung. Seine Hilfestellungen und Anregungen waren für mich von unschätzbarem Wert.

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

Besonderen Dank möchte ich auch Frau Dr. B. Viertböck, die mir trotz Elternzeit immer durch konstruktive Beiträge zur Seite stand, aussprechen.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Deeg, der Arbeitsgruppe Kaspers und der Arbeitsgruppe Schneider für das freundliche Arbeitsklima innerhalb des Instituts und die gute Zusammenarbeit.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die tolle gemeinsame Zeit im Labor danken.

Mein Dank gilt ferner meiner Mitstreiterin Marie-Luise Neulen, die in privaten und fachlichen Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Besonders danken möchte ich Susanne Röhl, Julia Schermuly und Maria Zechmann für die tiefe Freundschaft, die uns verbindet und die lustige gemeinsame Zeit.

Ich danke David für seine Unterstützung und Hilfe.

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

Mein Dank gilt auch meiner Schwester Katharina, meiner ständigen Wegbegleiterin und größten Vertrauten, für ihre Loyalität und Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Mutter, die mir durch ihre Stärke, ihren Mut und ihren Optimismus immer ein Vorbild sein wird.