

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

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertböck

**Charakterisierung von TREM-B1:
ein hemmender Rezeptor auf Thrombozyten des
Haushuhns**

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

von
Vanessa Turowski
aus
Bremerhaven

München 2016

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertlböck

Korreferent/en: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	2
3	Literaturübersicht	3
	3.1 Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie	3
	Allgemeine Charakteristika.....	3
	Aktivierende Ig-ähnliche Rezeptoren.....	3
	Inhibitorische Ig-ähnliche Rezeptoren	4
	3.2 TREM beim Säuger	6
	TREM-1	9
	TREM-2.....	10
	TREM-3.....	11
	TREM-4 (pDC-TREM).....	11
	TREM-like Transcript-1 (TLT-1; TREML1)	11
	TREM-like Transcript-2 (TLT-2; TREML2)	14
	TREM-like Transcript-4 (TLT-4; TREML4)	15
	TREM-like Transcript-3 und -6 (TLT-3/-6; TREML3/-6).....	15
	3.3 TREM beim Huhn	16
4	Publikation	21
5	Diskussion	41
6	Zusammenfassung	49
7	Summary	51
8	Literaturverzeichnis	53
9	Danksagung	59

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle (engl. <i>Antigen Presenting Cell</i>)
Bp	Basenpaar
CD	Cluster Nomenklatur (engl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
CD3 ζ	zeta-Kette von CD3
CD200R	<i>CD200 Receptor Family</i>
CD300L	<i>CD300 Antigen Like Family Member</i>
CHIR	<i>Chicken Ig-like Receptor</i>
CpG	Dinukleotid aus Cytosin-Phosphat-Guanin
DAP12	<i>DNAX Activation Protein of 12 kDa</i>
DAP10	<i>DNAX Activation Protein of 10 kDa</i>
DIC	Disseminierte Intravasale Koagulopathie (engl. <i>Disseminated Intravascular Coagulation</i>)
ERM	Proteinfamilie bestehend aus Ezrin, Radixin und Moesin
Fc ϵ R1 γ	γ -Kette des IgE-Rezeptors
FOXP4	<i>Forkhead Box P4</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
ILC3	<i>Group 3 Innate Lymphoid Cells</i>
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv (engl. <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif</i>)
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes hemmendes Motiv (engl. <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i>)
ITSM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Wechselmotiv (engl. <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
LR17	Sequenz von 17 Aminosäuren in der extrazellulären Domäne von TLT-1
MDFI	<i>MyoD Family Inhibitor</i>

NFYA	<i>Nuclear Transcription Factor-Yα</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKp44	<i>Natural Killer Cell p44-related Protein</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLOSL	Polyzystische Lipomembranöse Osteodysplasie mit Sklerosierender Leukoenzephalopathie
Poly-A	Polyadenylierung
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
rsTLT-1	rekombinantes lösliches TLT-1 (engl. <i>recombinant soluble TLT-1</i>)
scFv	<i>single-chain variable Fragment</i>
SH3	<i>Src Homology 3</i>
SHIP	<i>Src Homology 2-containing</i> Inositol-5-Phosphatase
SHP	<i>Src Homology 2-containing</i> Protein-Tyrosin-Phosphatase
SIRP	<i>Signal-regulatory Protein</i>
Src	Zusammengesetztes Akronym aus <i>sarcoma</i> und <i>cellular</i>
sTLT	lösliches TLT (engl. <i>soluble TLT</i>)
sTREM	lösliches TREM (engl. <i>soluble TREM</i>)
Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (engl. <i>Toll-like Receptor</i>)
TLT	<i>TREM-like Transcript</i> (auch TREML)
TLT-1sp	Splice-Variante von TLT-1
TREM	<i>Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells</i>
TREM-B1sp	Splice-Variante von TREM-B1
TREML	<i>TREM-like Transcript</i> (auch TLT)
ZAP-70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

1 Einleitung

Das Immunsystem ist ein lebensnotwendiges Abwehrsystem biologischer Organismen zum Schutz vor eingedrungenen Mikroorganismen, körperfremden Substanzen oder körpereigenen, fehlerhaften Zellen. Die Heterogenität an potentiellen Krankheitserregern erfordert ein hohes Maß an Komplexität des Systems. Neben diversen löslichen Komponenten wie den Antikörpern, den Plasmaproteinen des Komplementsystems oder den Interleukinen, stehen für eine effektive und zielgerichtete Verteidigung unterschiedlichste Immunzellen zur Verfügung. Diese zelluläre Immunität besteht zum einen aus den Monozyten, Makrophagen, polymorphkernigen Granulozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen des angeborenen Immunsystems und zum anderen aus den B- und T-Zellen des adaptiven Immunsystems. Die Informationsweitergabe in das Zellinnere und der Informationsaustausch der Immunzellen untereinander sind Voraussetzungen für eine adäquate Immunantwort. Für eine koordinierte und balancierte Reaktion des Immunsystems erhalten die Zellen je nach Stimulus aktivierende oder hemmende Signale. Hierfür stehen den Zellen unter anderem eine Vielzahl an aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zur Verfügung. Diese sogenannten immunregulatorischen Rezeptoren der Leukozyten gehören entweder zu der Gruppe der C-Typ Lektine oder sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie [1]. Im Genom des Haushuhns wurden in den letzten Jahren mehrere solche Rezeptorfamilien identifiziert. Nach der Entdeckung der *Chicken Ig-like Receptors* (CHIR) folgte die Identifizierung weiterer Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie wie die *Signal-regulatory Proteins* (SIRP), die *CD200 Receptor Family* (CD200R), die *CD300 Antigen Like Family Members* (CD300L) und die *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells* (TREM) [2-4]. Einige ausgewählte Vertreter dieser Ig-ähnlichen Rezeptorfamilien wurden bereits eingehend untersucht [5-14]. Neben dem genauen Expressionsmuster konnten zum Teil auch Liganden und somit potentielle Funktionen ermittelt werden. Für einen Großteil der immunregulatorischen Rezeptoren des Haushuhns steht dies jedoch noch aus.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die eingehende Charakterisierung des Ig-ähnlichen Rezeptors TREM-B1 beim Haushuhn. Als immunregulatorischer Rezeptor stellt dieser einen möglichen Ansatzpunkt für die Modulation des Immunsystems dar. Hierzu bedarf es jedoch eines tiefgründigen Verständnisses über die Funktion des Rezeptors und seine Interaktion mit anderen Leukozyten. Als Grundlage für ein solches Verständnis sollten das Expressionsmuster, die biochemischen Eigenschaften und die intrazelluläre Signaltransduktion des Rezeptors sowie seine potentiell hemmende Wirkung untersucht werden. Nach der Identifizierung des Rezeptors im Hühnergenom mit anschließender detaillierter Sequenzanalyse und einer initialen Charakterisierung der Gewebeverteilung mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) [15], sollte nun die Klonierung und Etablierung verschiedener Zelllinien erfolgen, welche den Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Neben den Untersuchungen zur Biochemie und Signaltransduktion sollten diese Zelllinien für die Herstellung eines TREM-B1-spezifischen monoklonalen Antikörpers verwendet werden, um anschließend die Proteinexpression auf nativen Leukozyten in der Durchflusszytometrie analysieren zu können. Darüber hinaus sollte das hemmende Potential von TREM-B1 mittels eines CD107-Degranulations-Assays untersucht werden.

3 Literaturübersicht

3.1 Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie

Allgemeine Charakteristika

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) ist eine Gruppe von Proteinen, denen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Immunglobulinen gemein ist. Zu den Vertretern zählen neben löslichen Proteinen auch zahlreiche Oberflächenrezeptoren, welche unter anderem in großem Maß auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Biochemisch handelt es sich bei den Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Rezeptoren um Typ-I-Transmembranproteine mit einem extrazellulär gelegenen N-Terminus. Die extrazelluläre Region besteht aus einer unterschiedlichen Anzahl an sogenannten Ig-Domänen. Diese besitzen eine typische Immunglobulin-Faltung aus zwei antiparallel verlaufenden β -Faltblättern, welche durch Disulfidbrücken und polaren Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren stabilisiert wird. Eine Klassifizierung der Ig-Domänen erfolgt nach der Anzahl an β -Ketten und der Sequenzlänge zwischen den konservierten Cystein-Resten in die Subtypen V, C1 und C2 sowie I [16, 17]. Funktionell lassen sich Ig-ähnliche Rezeptoren in aktivierende oder hemmende (inhibitorische) Rezeptoren einteilen [18]. Diese weisen sowohl im transmembranen als auch im zytoplasmatischen Bereich spezifische Charakteristika auf.

Aktivierende Ig-ähnliche Rezeptoren

Die aktivierenden Ig-ähnlichen Rezeptoren besitzen eine kurze zytoplasmatische Domäne und einen positiv geladenen Transmembranbereich mit Arginin oder Lysin als basische Aminosäure. Diese positiv geladene Aminosäure ermöglicht die Assoziation mit einem Adaptermolekül, welches seinerseits eine negativ geladene Aminosäure im Transmembranbereich enthält. Je nach Rezeptor handelt es sich bei den Adaptermolekülen um die als Homodimer exprimierten Proteine Fc ϵ R1y, CD3 ζ , *DNAX Activation Protein of 12 kDa* (DAP12) oder *DNAX Activation Protein of 10 kDa* (DAP10) [16, 18]. In ihren zytoplasmatischen Domänen

enthalten diese Tyrosin-haltige Signaltransduktionsmotive. DAP12, CD3 ζ und Fc ϵ R1 γ besitzen klassische Immunrezeptor Tyrosin-basierende aktivierende Motive (ITAM) [19], wohingegen DAP10 ein aktivierendes YxxM-Motiv aufweist, bei dem ein Tyrosin und ein Methionin den Rahmen für zwei beliebige Aminosäuren bilden [20]. Das klassische ITAM besteht aus einem Motiv, bei dem ein Tyrosin durch zwei beliebige Aminosäuren von einem Leucin oder Isoleucin getrennt ist und sich im Abstand von sechs bis acht Aminosäuren wiederholt (YxxL/Ix₍₆₋₈₎YxxL/I) [21].

Eine Aktivierung der Ig-ähnlichen Rezeptoren nach Interaktion mit einem spezifischen Liganden führt zur Phosphorylierung der Tyrosinreste in den Signaltransduktionsmotiven. Die anschließende Rekrutierung und Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen wie *Syk* und *ZAP-70* führt über unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden zu einer Aktivierung der Zelle und somit zur Ausführung zellspezifischer Funktionen [22].

Inhibitorische Ig-ähnliche Rezeptoren

Im Gegensatz zu den aktivierend wirkenden Rezeptoren zeichnen sich die inhibitorischen Rezeptoren durch einen ungeladenen Transmembranbereich und eine lange zytoplasmatische Domäne mit einer unterschiedlichen Anzahl an hemmenden Signaltransduktionsmotiven aus [18]. Das klassische Immunrezeptor Tyrosin-basierende inhibitorische Motiv (ITIM) besteht aus sechs Aminosäuren: I/V/L/SxYxxI/L/V. Hierbei ist die erste Aminosäure entweder ein Isoleucin, Valin, Leucin oder Serin, gefolgt von einer beliebigen Aminosäure mit nachstehendem Tyrosin, welches durch zwei weitere beliebige Aminosäuren von einem Isoleucin, Leucin oder Valin getrennt ist [23].

Die Bindung eines spezifischen Liganden an den Rezeptor bewirkt eine Phosphorylierung der Tyrosinreste in den ITIM durch Kinasen der Src Familie. Nachfolgend werden *Src Homology 2-containing* Protein-Tyrosin-Phosphatasen (SHP) wie SHP-1, SHP-2 oder die *Src Homology 2-containing* Inositol-5-Phosphatase (SHIP) zu den phosphorylierten ITIM rekrutiert. Diese führen zur Dephosphorylierung von aktivierend wirkenden Rezeptoren und Molekülen und üben somit durch die

Hemmung der aktivierenden Signaltransduktionskette einen inhibitorischen Effekt auf die Zelle aus [22].

Eine Modifikation des klassischen ITIM stellt das Immunrezeptor Tyrosin-basierende Wechselmotiv (ITSM) dar. Bei diesem Signaltransduktionsmotiv ist die erste Aminosäure der Konsensussequenz des ITIM durch ein Threonin ersetzt (TxYxxI/V) [24]. Im Gegensatz zum ITIM können jedoch durch das Wechselmotiv sowohl Adaptermoleküle rekrutiert werden, die eine aktivierende Signaltransduktion induzieren, als auch solche, die eine hemmende Signaltransduktionskaskade einleiten [24-28]. Abhängig von den intrazellulären, physiologischen Bedingungen, ermöglicht das ITSM somit einen Wechsel zwischen aktivierender und inhibitorischer Signalgebung.

3.2 TREM beim Säuger

Die Familie der TREM stellt beim Säuger eine Multigenfamilie dar, die beim Mensch auf Chromosom 6p21.1 und bei der Maus auf Chromosom 17C3 lokalisiert ist [18, 29, 30]. Neben den TREM Genen ist in dem humanen Cluster auch das Gen für den aktivierend wirkenden Rezeptor *Natural Killer Cell p44-related Protein* (NKp44) enthalten, welcher ausschließlich auf aktivierten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und aktivierten *Group 3 Innate Lymphoid Cells* (ILC3) exprimiert wird [18, 31-33]. Bei den TREM Proteinen handelt es sich um Zelloberflächenrezeptoren der IgSF, denen allen eine einzelne Ig-Domäne vom V-Typ gemein ist [1]. Die Rezeptoren sind auf unterschiedlichsten Zellen myeloiden Ursprungs exprimiert und erhielten daher die Bezeichnung *Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells* (TREM). Strukturell werden die Mitglieder der Familie in die TREM und die *TREM-like Transcripts* (TREML, auch TLT) unterteilt.

Die TREM sind durch einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt ohne bekanntes Signalmotiv und ein positiv geladenes Lysin im Transmembranbereich charakterisiert. Somit handelt es sich um typisch aktivierende Ig-ähnliche Rezeptoren. Die Signaltransduktion erfolgt über die Assoziation mit dem Adaptermolekül DAP12 [1].

Die später entdeckten TREML besitzen mit einer ungeladenen transmembranen Region und einem langen zytoplasmatischen Bereich mit typisch hemmenden Signalmotiven die üblichen Merkmale eines inhibitorischen Ig-ähnlichen Rezeptors [18].

Bisher konnten vier verschiedene TREM und fünf verschiedene TREML identifiziert werden. So beinhaltet der humane Gen-Cluster TREM-1, -2 und -3 sowie TREML1, -2, -3 und -4 [1, 18, 34-36]. TREM-3 stellt dabei lediglich ein Pseudogen dar [18]. Die murine TREM Familie umfasst Trem-1, -2, und -3 sowie Trem11, -2, -4 und -6, wobei Trem-3 für ein funktionelles Protein kodiert [29, 34-42]. Zusätzlich konnte ein TREM Mitglied identifiziert werden, welches auf plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) exprimiert wird und als pDC-Trem oder Trem-4

bezeichnet wird [39]. Das Gen für NKp44 ist im murinen Gen-Cluster nicht enthalten [18]. Für einen Großteil der zahlreichen TREM Gene konnten inzwischen funktionelle Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Die Organisation der TREM Gene bei Mensch und Maus ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

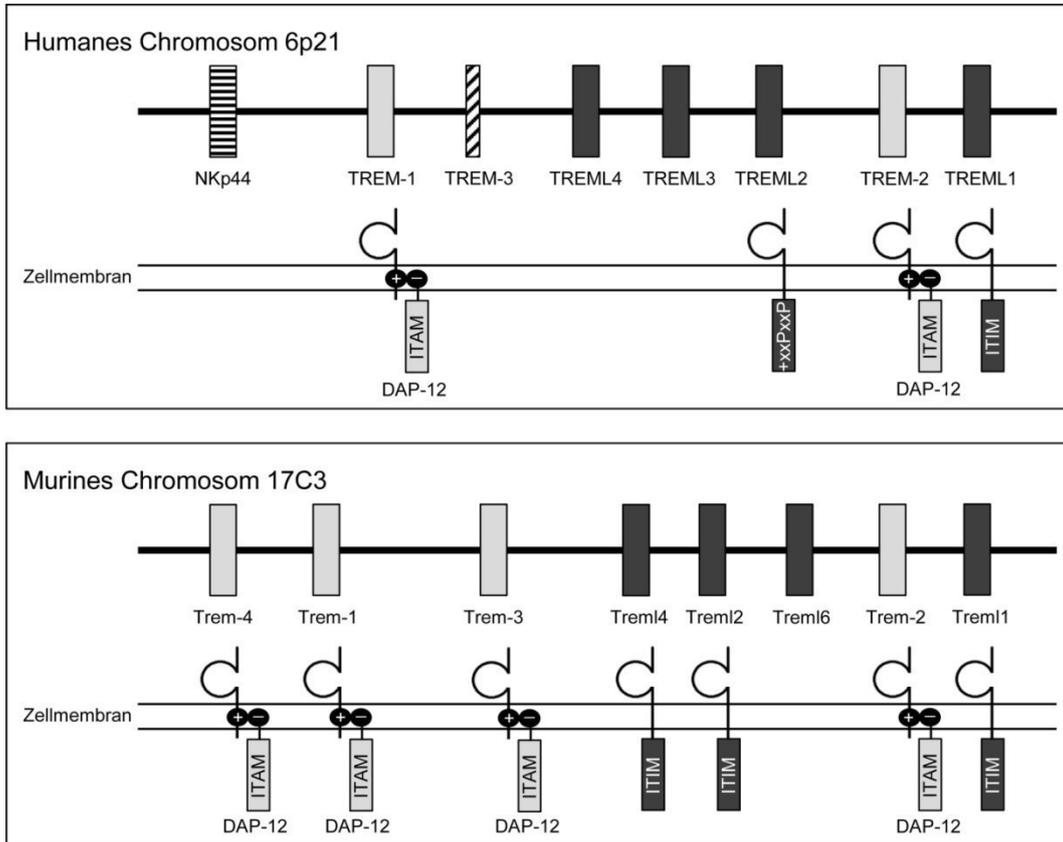


Abbildung 1: Schematischer Vergleich der TREM Gene bei Mensch und Maus. Der humane Locus auf Chromosom 6p21 beinhaltet auch das Gen für den Rezeptor NKp44 (horizontal gestreifter Balken). Der murine TREM-Cluster befindet sich auf Chromosom 17C3. Modelle für die kodierten Proteine sind unter den entsprechenden Genen dargestellt. TREM-3 ist beim Mensch ein Pseudogen (schraffierter Balken). Die TREM Rezeptoren (hellgraue Balken) vermitteln ihre Signalgebung durch das ITAM-haltige Adaptermolekül DAP12. Plus (+) und Minus (-) deuten die jeweilige Ladung des Transmembranbereichs an. Die TREML Proteine (dunkelgraue Balken) besitzen dagegen hemmende ITIM im zytoplasmatischen Bereich. Eine Ausnahme stellt das humane TREML2 dar, welches eine potentielle SH3-Bindungsdomäne (+xxPxxP) besitzt. Abbildung modifiziert nach Genua et al. [36].

Bei den TREM Proteinen handelt es sich zwar typischerweise um membranständige Rezeptoren, jedoch konnten für einige Mitglieder lösliche Formen nachgewiesen werden. Diese umfassen lösliches (*soluble*) TREM-1 (sTREM-1), TREM-2 (sTREM-2) und

TLT-1 (sTLT-1) [37, 43-45]. Ob es sich dabei um sezernierte alternative Splice-Varianten oder um hydrolytisch abgespaltene extrazelluläre Domänen der membranständigen Rezeptoren handelt ist noch nicht abschließend geklärt [36, 46]. Auch die Funktion dieser löslichen Formen ist bisher noch unklar. Im Gespräch ist eine mögliche Hemmung des entsprechenden membranständigen Rezeptors durch die Konkurrenz um den gleichen Liganden [47, 48]. In jedem Fall besitzen sie eine potentielle Eignung als biologische Marker, da sowohl bei Tieren als auch bei Menschen mit entzündlichen oder infektiösen Erkrankungen lösliche Formen von TREM Rezeptoren nachgewiesen werden konnten [49-55].

Die TREM Mitglieder sind vornehmlich auf Zellen der myeloiden Linie exprimiert [18]. So exprimieren Monozyten, Makrophagen, myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Mikroglia, Osteoklasten als auch Thrombozyten mindestens ein Mitglied der TREM Familie [35]. Darüber hinaus konnten Rezeptoren dieser Familie inzwischen auch bei anderen Zelltypen wie Endothel- oder Epithelzellen [56-58] sowie in verschiedensten Geweben wie Plazenta, Lymphknoten, Rückenmark, Lunge, Herz und Milz [59] nachgewiesen werden. Eine Übersicht über das breit gefächerte Expressionsmuster der TREM Mitglieder zeigt Tabelle 1.

Table 1 | Cellular expression profiles of the TREM family proteins.

Cell type/tissue	Species	References
TREM-1		
Neutrophils, CD14 ^{high} Monocytes	Human	Bouchon et al., 2000
NK cell line, fibrosarcoma (HT1080)	Human	Allcock et al., 2003
Differentiated U937 cells	Human	Gingras et al., 2002
Lymph nodes, placenta, spinal cord, lung, spleen, and heart tissues	Human	Gingras et al., 2002
High expression: Monocytes, granulocytes, DCs, NK cell	Human	Matesanz-Isabel et al., 2011
Low expression: T cells and all subsets of B cells except plasma cells		
Normal bronchial epithelial cells	Human	Rigo et al., 2011
Myofibroblasts and primary hepatic stellate cells	Human	Liao et al., 2012
Gastric epithelial cell lines	Human	Schmaußer et al., 2008
Liver endothelial cells	Mouse	Chen et al., 2008
Kupfer cells and neutrophils	Mouse	Wu et al., 2012
Peritoneal macrophages	Mouse	Bouchon et al., 2001a
Immature dendritic cells	Mouse	Zangi et al., 2012
TREM-2		
Monocyte derived dendritic cells	Human	Bouchon et al., 2001a
NK cell line, fibrosarcoma (HT1080), U937, and THP-1	Human	Allcock et al., 2003
Activated macrophages, peritoneal macrophages, RAW264 cells	Mouse	Turnbull et al., 2006
Osteoclasts	Human	Paloneva et al., 2003
Microglia	Mouse	Schmid et al., 2002
High expression in CNS, heart and lungs as compared to lymph nodes, kidney, liver, and testes	Mouse	Schmid et al., 2002
TREM-3		
RAW264, MT2 macrophage cell lines, and T cell lines	Mouse	Chung et al., 2002
pDC-TREM (TREM-4)		
pDCs (CD11c ^{dull} population)	Mouse	Watarai et al., 2008
TLT-1		
Platelets and megakaryocytes	Mouse	Washington et al., 2004
TLT-2		
B cells, neutrophils, and macrophages	Mouse	King et al., 2006

Tabelle 1: Expressionsmuster der TREM Proteine. Tabelle entnommen aus Roe et al. [60].

Die TREM Rezeptoren spielen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunität eine wichtige Rolle [61]. Dabei sind sie vor allem bei der Feinabstimmung von Entzündungsreaktionen von Bedeutung [35]. Die Familienmitglieder weisen untereinander nur eine geringe Sequenzhomologie auf [62]. Entsprechend der Heterogenität im Expressionsmuster und in der Proteinsequenz besitzen die TREM Rezeptoren sehr unterschiedliche Funktionen.

Nachfolgend soll ein kurzer Überblick über die strukturellen Merkmale, das Expressionsmuster und die Funktion der einzelnen TREM Mitglieder gegeben werden. Dabei wird insbesondere auf das humane TLT-1 (auch TREML1) detaillierter eingegangen, welches eine Homologie zu TREM-B1 aufweist.

TREM-1

TREM-1 wurde im Jahr 2000 als erstes Mitglied der TREM Familie identifiziert und ist neben TREM-2 am besten charakterisiert [1]. Es handelt sich dabei um einen aktivierenden Rezeptor, dessen Expression bei unterschiedlichsten Zelltypen nachgewiesen wurde. Während bei

neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen eine proinflammatorische Funktion für TREM-1 gezeigt werden konnte [1, 34, 63], ist seine Funktion in Epithel- und Endothelzellen bisher noch unklar. So konnte in einer In-vivo-Studie eine Hochregulation der TREM-1 Expression auf Monozyten gezeigt werden, die mit einem Anstieg der löslichen Rezeptorform sTREM-1 einherging [44]. Außer der verstärkenden Wirkung im Entzündungsgeschehen ist TREM-1 an der Modulation anderer Signalwege der *Pattern Recognition Receptors* (PRR) und an der Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) beteiligt [63-66]. Ein Ligand für TREM-1 konnte auf Thrombozyten sowie auf aktivierten neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [67, 68]. Trotz intensiver Bemühungen ist es aber bisher nicht gelungen, den Liganden zu identifizieren.

TREM-2

TREM-2 besitzt unter den TREM Mitgliedern die größte Expressionsbreite und somit verschiedenste Funktionen. Neben der Expression auf myeloiden dendritischen Zellen, Makrophagen, Osteoklasten und Mikroglia, konnte der Rezeptor in einer Vielzahl von Geweben (Niere, Leber, Herz, Lunge und Gehirn) nachgewiesen werden [37, 69-71]. Obwohl für TREM-2 eine Interaktion mit dem ITAM-haltigen Adaptermolekül DAP12 dargelegt ist, besitzt TREM-2 im Gegensatz zu TREM-1 eine inhibitorische Funktion im Entzündungsgeschehen und wird daher als Negativ-Regulator der Immunantwort beschrieben [1, 35]. So konnte gezeigt werden, dass durch TREM-2 die Interleukin (IL)-6- und Tumornekrosefaktor (TNF)-Produktion in Makrophagen gehemmt wird [70, 72]. Darüber hinaus ist der Rezeptor unter anderem an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt und steht im Zusammenhang mit der seltenen Erkrankung Nasu Hakola (auch polyzystische lipomembranöse Osteodysplasie mit sklerosierender Leukoenzephalopathie, PLOSL), welche sich durch die Ausbildung von Knochenzysten und die Entwicklung einer präsenilen Demenz manifestiert [69, 73]. Die Expression eines TREM-2 Liganden konnte auf Knochenmarkzellen, in der Zellmembran GRAM positiver und

negativer Bakterien sowie auf der Astrozytom-Zelllinie HTB12 [72, 74, 75] nachgewiesen werden.

TREM-3

TREM-3 stellt beim Mensch ein Pseudogen dar [18]. Bei der Maus wurde ein funktionelles Protein in Makrophagen nachgewiesen, welches nach Stimulation mit LPS hochreguliert wird [56]. Es handelt sich um einen DAP12-assoziierten Rezeptor, dessen Aminosäuresequenz zu 43 % mit der von TREM-1 übereinstimmt [62]. Daher kann für TREM-3 eine aktivierende, TREM-1-ähnliche Funktion angenommen werden.

TREM-4 (pDC-TREM)

TREM-4 wird auf CpG (Cytosin-Phosphat-Guanin)-aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen der Maus exprimiert und daher auch als pDC-TREM bezeichnet. Es konnte für den Rezeptor eine aktivierende Wirkung auf die Interferon (IFN)- α -Produktion dieser Zellen gezeigt werden. Die Signaltransduktion von TREM-4 wird vermutlich wie bei TREM-1 und TREM-2 über DAP12 vermittelt [39].

TREM-like Transcript-1 (TLT-1; TREML1)

TLT-1 wurde im Jahr 2002 erstmals näher charakterisiert und ist unter den *TREM-like* Proteinen am besten untersucht.

Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Ig-Domäne vom V-Typ, einem ungeladenen Transmembranbereich und einer langen zytoplasmatischen Region mit einem ITIM und einem ITSM [40, 76]. Neben den hemmenden Signalmotiven besitzt der Rezeptor im zytoplasmatischen Abschnitt eine Prolin-reiche Region, welche eine potentielle Bindungsstelle für *Src Homology 3* (SH3)-Domänen (PxxPx+; P steht für Prolin, x für eine beliebige Aminosäure, + für ein positiv geladenes Arginin) enthält [18]. Darüber hinaus existieren zwei Splice-Varianten (TLT-1sp), von welchen die eine für einen TLT-1 Form mit einem kurzen zytoplasmatischen Abschnitt ohne Signalmotive und die andere ausschließlich für die extrazelluläre

Domäne von TLT-1 kodiert [18, 76, 77]. Auch eine lösliche Form des Rezeptors (sTLT-1) wurde nachgewiesen [45].

TLT-1 besitzt die strukturellen Merkmale eines typisch inhibitorischen Rezeptors. Die initiale Charakterisierung zeigte, dass eine Phosphorylierung des Rezeptors zur Rekrutierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-1 führt und wies somit eine potentiell hemmende Wirkung nach [40]. Im Gegensatz dazu wurde der Rezeptor in späteren Untersuchungen als kostimulatorischer Rezeptor beschrieben. In diesen Versuchen konnte eine Rekrutierung von SHP-1 oder SHIP nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine Assoziation mit SHP-2 gezeigt, welche zu einer FcεRIγ-vermittelten Kalzium-Freisetzung führte [76]. Dies ist ein außergewöhnliches Ergebnis, da ITIM-haltige Rezeptoren in der Regel eine Abnahme der Kalzium-Freisetzung induzieren.

TLT-1 wird ausschließlich in den α-Granula von Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert [76, 78]. Die Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin, Kollagen oder LPS führt zu einer umgehenden Expression auf der Zelloberfläche [78, 79].

Fibrinogen wurde 2009 als Ligand von TLT-1 identifiziert [77]. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Fibrinogen an TLT-1 eine Thrombozytenaggregation induziert. Dabei kommt es durch eine Interaktion mit den Zytoskelett-assoziierten ERM Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin zu einer Verlinkung von Fibrinogen an das Zytoskelett [77]. Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie nachgewiesen, dass ein rekombinant hergestelltes, lösliches TLT-1 (rsTLT-1) einen Einfluss auf die Aktinpolymerisation der Thrombozyten hat, welche zur Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien führt. Diese Scheinfüßchen sind neben einer sphäroiden Zellform ein typisches morphologisches Merkmal aktivierter Thrombozyten. Außerdem führte die Anwesenheit des rsTLT-1 zur gesteigerten Adhäsion von Thrombozyten an Endothelzellen [80].

Des Weiteren wurden Untersuchungen an TLT-1 Knockout-Mäusen durchgeführt [77]. Diese Tiere zeigten neben einer verlängerten Schwanzblutungszeit eine Prädisposition für die Ausbildung einer

Hämorrhagie infolge lokal-entzündlicher Läsionen. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen führte eine Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) bei diesen Tieren zu erhöhten TNF- und D-Dimer- Plasmaspiegeln. Außerdem war die LPS-Behandlung für die Knockout-Tiere stets letal, während unter den Wildtyp-Tieren 15-20 % überlebten. Auch eine erhöhte Anfälligkeit für polymikrobielle Infektionen ist bei diesen Tieren beschrieben [81].

Eine lösliche Form von TLT-1 (sTLT-1) wurde zunächst ausschließlich im humanen und murinen Serum gesunder Individuen gefunden [45]. Nachfolgend konnten beträchtliche Plasmaspiegel von sTLT-1 bei an Sepsis erkrankten Patienten nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Korrelation zwischen dem sTLT-1-Plasmaspiegel und dem Auftreten einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) beobachtet [77]. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die lösliche Form infolge von hydrolytischer Spaltung des membranständigen Rezeptors entsteht oder ob es sich dabei um eine der zuvor beschriebenen alternativen Splice-Varianten handelt [45]. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die extrazelluläre Domäne von TLT-1 infolge von Expression auf aktivierten Thrombozyten abgespalten wird [81]. Auch die Funktion von sTLT-1 ist noch nicht abschließend geklärt. In einer aktuelleren Studie wird für sTLT-1 eine entzündungshemmende Funktion bei Sepsis beschrieben [81]. Dabei konnte in der extrazellulären Domäne eine Sequenz von 17 Aminosäuren (LR17) identifiziert werden, welche mit TREM-1 um dessen Liganden konkurriert und dadurch die proinflammatorische Wirkung von TREM-1 hemmt. Eine Behandlung von septischen Mäusen mit LR17 führte zu einer verbesserten Überlebenschance [81].

Zusammenfassend spielt TLT-1 unter anderem eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und der Regulation der Koagulation. Hier scheint der Rezeptor über eine Aktinpolymerisation zu einer gesteigerten Thrombozytenaggregation sowie einer gesteigerten Adhäsion der Thrombozyten an Endothelzellen zu führen. Darüber hinaus besitzt der Rezeptor eine immunmodulatorische Funktion, die nicht über die zytoplasmatischen Signalmotive vermittelt wird, sondern über eine 17 Aminosäuren lange Sequenz der extrazellulären Domäne. Die

antiinflammatorische Wirkung wird vermutlich über eine Hemmung der TREM-1-induzierten Aktivierung von Leukozyten vermittelt.

TLT-1 bietet somit verschiedene klinische Nutzungsmöglichkeiten. Neben dem Einsatz als prognostischer Marker bei DIC, bietet TLT-1 einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung von verschiedenen Koagulationsstörungen [77]. Eine Hemmung von Thrombin-vermittelter Thrombozytenaggregation konnte bereits mittels eines TLT-1-spezifischen scFv (*single chain variable fragment*)-Antikörpers gezeigt werden [82]. Auch der Einsatz von sTLT-1 als diagnostischer Marker für die Beurteilung von DIC ist inzwischen in der Literatur beschrieben [83].

TREM-like Transcript-2 (TLT-2; TREML2)

TLT-2 wird auf murinen B-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimiert [41]. Außerdem konnte eine konstitutive Expression auf CD8-positiven T-Zellen und eine induzierte Expression auf aktivierten CD4-positiven T-Zellen nachgewiesen werden [84]. Im Gegensatz zu den B-Zellen, führt eine LPS-Stimulation bei den Zellen myeloiden Ursprungs zu einer Hochregulation des Rezeptors [41]. Während das murine TLT-2 einen ITIM-haltigen zytoplasmatischen Bereich aufweist, besitzt das humane TLT-2 zwei potentielle Signalmotive, von denen das eine ein Endozytose-Motiv (YxxV; Y steht für Tyrosin, x für eine beliebige Aminosäure, V für Valin) und das andere ein SH3-Bindungsmotiv (+xxPxxP; + steht für ein positiv geladenes Arginin, x für eine beliebige Aminosäure, P für Prolin) ist [18, 36]. Das Membranprotein B7-H3 wurde als ein Ligand für TLT-2 identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Mitglied der B7 Familie, für welches sowohl kostimulatorische als auch koinhibitorische Funktionen bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort beschrieben wurden. Für TLT-2 konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion des Moleküls mit dem auf T-Zellen exprimierten Rezeptor zu einer gesteigerten T-Zell-Aktivierung führt [84].

TREM-like Transcript-4 (TLT-4; TREML4)

Die Expression von TLT-4 konnte bei der Maus auf Subpopulationen von dendritischen Zellen und Milzmakrophagen gezeigt werden [42]. Der Rezeptor assoziiert mit DAP12 und bindet an apoptotische und nekrotische Zellen [42]. Außerdem wurde gezeigt, dass TLT-4 bei der Präsentation von Antigenen eine Rolle spielt und bei der durch den Toll-ähnlicher Rezeptor (TLR)-7-induzierten Produktion proinflammatorischer Zytokine eine aktivierende Funktion besitzt [85, 86]. Es ist noch unklar, ob TLT-4 beim Mensch für eine lösliche Form kodiert oder ob es sich um ein Pseudogen handelt [42].

TREM-like Transcript-3 und -6 (TLT-3/-6; TREML3/-6)

Für TLT-3 und -6 wurde in der Literatur bisher kein funktionelles Protein beschrieben.

3.3 TREM beim Huhn

Die TREM Familie des Haushuhns wurde erstmals 2006 von Viertlboeck et al. beschrieben [3]. Nachdem im Jahr 2004 das Hühnergenom vollständig sequenziert vorlag, konnten drei TREM Gene durch den Vergleich mit humanen Gensequenzen sowie anhand von konservierter Syntenie identifiziert werden. Die drei identifizierten TREM Gene umfassen den potentiell aktivierenden Rezeptor TREM-A1 sowie die beiden potentiell hemmenden Rezeptoren TREM-B1 und TREM-B2 [3]. Eine Übersicht der TREM Mitglieder beim Huhn gibt Abbildung 2.

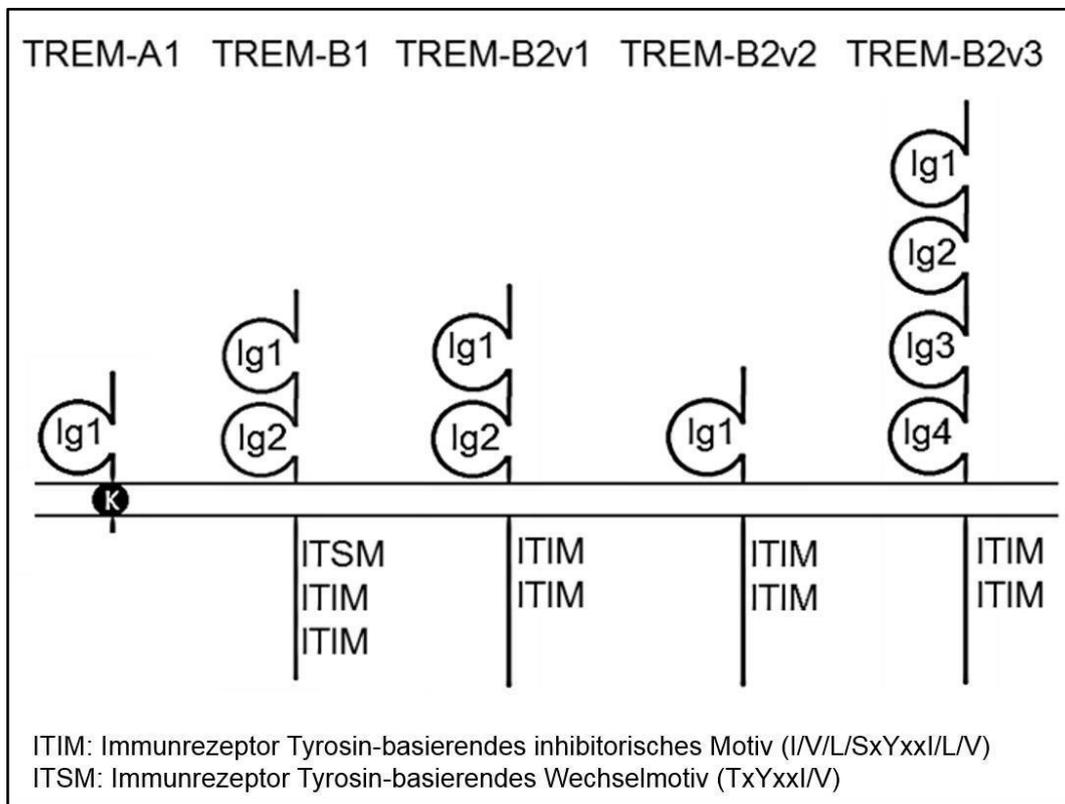


Abbildung 2: Schematische Darstellung der TREM Mitglieder des Haushuhns. Als Mitglieder der IgSF besitzen alle Rezeptoren extrazelluläre Ig-Domänen vom V-Typ. TREM-A1 besitzt ein positiv geladenes Lysin (K) im Transmembranbereich und einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt. TREM-B1 und TREM-B2 haben einen ungeladenen Transmembranbereich und hemmende Tyrosin-basierende Signalmotive in der zytoplasmatischen Region. Für TREM-B2 wurden drei alternative Splice-Varianten nachgewiesen.

Die Nomenklatur der TREM beim Huhn erfolgte gemäß ihrer Homologie zur humanen TREM Familie. Dabei erhielten Rezeptoren mit aktivierenden

Merkmale den Suffix –A und Rezeptoren mit typisch inhibitorischen Signalmotiven den Suffix –B. Zusätzlich ist jeder Rezeptor mit einer Nummer versehen, welche der chronologischen Reihenfolge der Entdeckung entspricht [3].

Der syntenische Locus der TREM befindet sich beim Haushuhn auf Chromosom 26 und wird wie beim Säuger durch die nicht verwandten Gene NFYA (*Nuclear transcription factor-Yα*), FOXP4 (*Forkhead Box P4*) und MDFI (*MyoD family inhibitor*) flankiert (Abb. 3) [3].

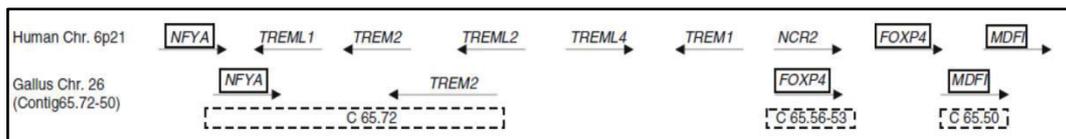


Abbildung 3: Schematische Darstellung des humanen TREM-Clusters auf Chromosom 6p21 verglichen mit dem ersten Modell des TREM Locus beim Haushuhn auf Chromosom 26 nach Viertelboeck et al. Die konservierten Gene NFYA, FOXP4 und MDFI flankieren die syntenische Region. Abbildung entnommen aus Viertelboeck et al. [3].

TREM-A1 und TREM-B1 wurden durch die ENSEMBL-Datenbank zunächst als ein einzelnes TREM Gen (TREM2) auf Contig 65.72 vorhergesagt (Abb. 3). In weiteren Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Gene handelt (Abb. 4). Nachdem die Sequenzierung des Abschnitts zwischen Contig 65.70 und Contig 65.71 gelungen war, konnte zudem TREM-B2 als dritter Vertreter der TREM Familie im Hühnergenom identifiziert werden (Abb. 4) [3].

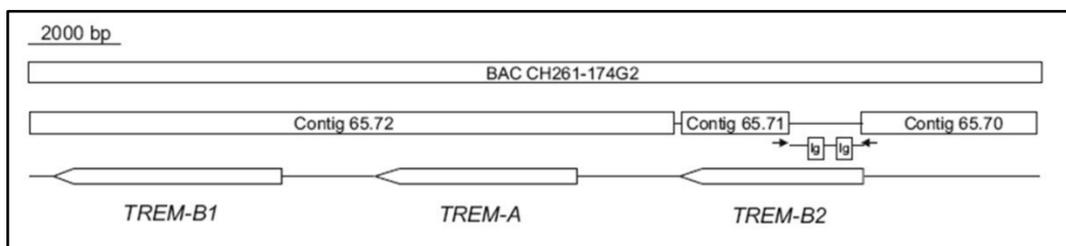


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Position und Orientierung der TREM Gene auf Chromosom 26 des Huhns. TREM-A1 (in der Abbildung TREM-A) und TREM-B1 wurden initial als TREM2 vorhergesagt. TREM-B2 wurde erst nach Sequenzierung des Abschnitts zwischen Contig 65.70 und Contig 65.71 identifiziert. Abbildung entnommen aus Viertelboeck et al. [3].

Die TREM Gene besitzen eine für die IgSF typische Exon-Intron-Struktur, bei der die Ig-Domänen durch separate Exons kodiert werden. Vergleichbar

mit den Mitgliedern der humanen TREM Familie variieren auch bei den einzelnen Mitgliedern des Huhns sowohl Länge, Anzahl als auch Verteilung der Introns sehr stark [3].

Alle drei Mitglieder besitzen TREM-charakteristische Ig-Domänen vom V-Typ, die in ihren Aminosäuresequenzen zu 16 % bis 33 % identisch sind. Darüber hinaus konnte bei allen TREM Genen des Huhns ein zusätzlicher Cysteinrest im c- und c'-Strang als weiteres typisches Merkmal der humanen TREM Mitglieder nachgewiesen werden. Eine Stammbaumanalyse wies darauf hin, dass zwischen den TREM Genen von Mensch und Huhn eine phylogenetisch engere Verwandtschaft besteht als zwischen den einzelnen humanen TREM Mitgliedern (Abb. 5). Zudem ergab eine Sequenzanalyse, dass die Homologie zwischen den TREM Mitgliedern von Huhn und Mensch teilweise größer ist als zwischen den einzelnen humanen Mitgliedern [3].

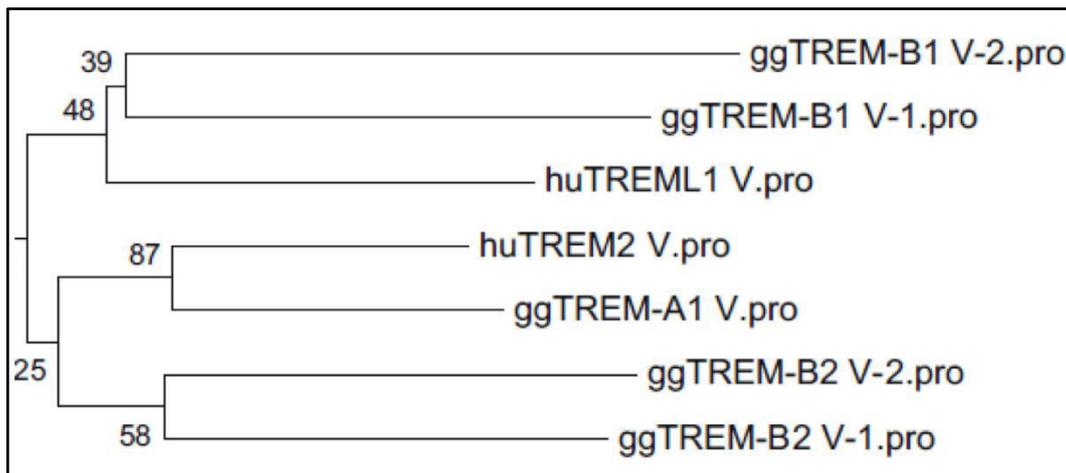


Abbildung 5: Phylogenetischer Vergleich der TREM Mitglieder des Haushuhns mit den entsprechenden Vertretern der humanen TREM Familie. Die einzelnen Ig-Domänen wurden mit dem ClustalW Algorithmus analysiert. Zur Erstellung des phylogenetischen Baums wurde MEGA 3.1. verwendet. Entnommen aus Viertelboeck et al. [3].

Für TREM-A1 und TREM-B1 konnten strukturell ähnliche Vertreter beim Säuger identifiziert werden. Hierbei handelt es sich bei TREM-A1 um das humane TREM-2 und bei TREM-B1 um das humane TLT-1 (auch TREML1) [3]. Von den drei Mitgliedern wurde bisher nur der potentiell aktivierende Rezeptor TREM-A1 ausführlich untersucht [13, 15]. Für die beiden anderen potentiell hemmenden Vertreter der Familie wurden zwar

initiale Sequenz- und Expressionsanalysen durchgeführt [3, 15], eine detaillierte Charakterisierung ist jedoch noch nicht erfolgt.

TREM-A1 ist unter den TREM Mitgliedern beim Huhn der einzige Rezeptor mit aktivierenden Merkmalen. Strukturell besteht er aus einer extrazellulären Ig-Domäne vom V-Typ und besitzt im transmembranen Bereich ein Lysin als positiv geladene Aminosäure (Abb. 2). Das Protein wird von einem Transkript mit einer Länge von 713 Basenpaaren (bp) kodiert [3]. Eine eingehende Expressionsanalyse mittels qPCR, Durchflusszytometrie und Immunhistochemie zeigte, dass der Rezeptor stark auf Makrophagen und Monozyten sowie auf heterophilen Granulozyten und NK-Zellen exprimiert ist. Aber auch auf Subpopulationen von Thrombozyten sowie B- und T-Zellen konnte eine Expression nachgewiesen werden. Hier war die Expressionshöhe jedoch geringer und variabel [13]. Die immunhistochemische Untersuchung des Gehirns ergab, dass TREM-A1 neben Mikroglia auch auf Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert ist [13]. Welches Adaptermolekül TREM-A1 zur Signaltransduktion verwendet, ist noch unklar. Aufgrund der Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu NKp44, TREM-1 und TREM-2, ist eine Assoziation mit dem gleichen Signalmolekül DAP12 denkbar. Ein Homolog zum DAP12 der Säuger konnte beim Huhn bisher jedoch noch nicht identifiziert werden [13]. Der Sequenzvergleich von TREM-A1 mit den humanen Rezeptoren TREM-1, TREM-2 und NKp44 ergab, dass TREM-2 mit einer Sequenzübereinstimmung von 30 % die größte Homologie zu TREM-A1 aufweist. Ein Vergleich der Ig-Domänen beider Rezeptoren zeigte sogar eine noch höhere Sequenzübereinstimmung von 44 %. Die Aminosäuresequenz des Transmembranbereichs gleicht, im Gegensatz zum extrazellulären Bereich, eher der transmembranen Proteinsequenz von NKp44. Dabei befindet sich das Lysin in exakt gleicher Position. Neben der Aminosäuresequenz kombiniert TREM-A1 auch das Expressionsmuster verschiedener TREM Mitglieder beim Säuger. So ist das humane TREM-2 auf Makrophagen, dendritischen Zellen, Osteoklasten, Mikroglia und einigen Neuronen exprimiert, während NKp44 auf NK-Zellen zu finden ist. TREM-A1 könnte daher auch die unterschiedlichen Funktionen dieser Rezeptoren vereinen [13]. Bisher ist über die Funktion von TREM-A1 noch

nicht viel bekannt. Mittels eines polyklonalen Antiserums gegen TREM-A1 konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des Rezeptors bei heterophilen Granulozyten alleine und in Synergie mit LPS zu einer schnellen Degranulation führt und die Fähigkeit zur Phagozytose verbessert. Außerdem konnte eine verstärkte Transkription proinflammatorischer Zytokine und Chemokine gezeigt werden. Ein oxidativer Burst von heterophilen Granulozyten infolge einer TREM-A1 Aktivierung konnte hingegen nur in Verbindung mit LPS beobachtet werden [87].

Die beiden potentiell inhibitorischen TREM Mitglieder des Huhns wurden im Gegensatz zu TREM-A1 bisher noch nicht genauer charakterisiert. Ein Sequenzvergleich der Ig-Domänen mit dem humanen TLT-1 ergab eine Homologie zwischen 10 % und 30 % [3].

TREM-B1 besitzt zwei Ig-Domänen von V-Typ, einen ungeladenen Transmembranbereich und einen langen zytoplasmatischen Abschnitt mit zwei ITIM und einem ITSM (Abb. 2). Das Gen kodiert für ein Protein von 411 Aminosäuren und liegt in unmittelbarer Nähe zu TREM-A1 [3].

Für TREM-B2 wurden bei der Expressionsanalyse mittels PCR drei unterschiedlich lange Transkripte nachgewiesen (TREM-B2v1, TREM-B2v2 und TREM-B2v3) (Abb. 2). Diese sind im Wesentlichen identisch, unterscheiden sich jedoch in der Anzahl ihrer Ig-Domänen. TREM-B2v1 wird durch 1341 bp kodiert und ist TREM-B1 strukturell sehr ähnlich. Es besteht aus zwei Ig-Domänen vom V-Typ und einer ungeladenen transmembranen Region. Wie bei TREM-B1 sind im zytoplasmatischen Bereich zwei ITIM enthalten, ein ITSM fehlt jedoch. Während TREM-B2v2 die Membran-proximale Ig-Domäne fehlt, weist TREM-B2v3 vier Ig-Domänen auf, welche eine Duplikation der TREM-B2v1 Domänen darstellt. Daher handelt es sich bei den verschiedenen Formen vermutlich um alternative Splice-Varianten [3].

4 Publikation



RESEARCH ARTICLE

Chicken TREM-B1, an Inhibitory Ig-Like Receptor Expressed on Chicken Thrombocytes

Vanessa Turowski, Beatrice Sperling, Matthias A. Hanczaruk[‡], Thomas W. Göbel, Birgit C. Viertlboeck*

Institute for Animal Physiology, Department for Veterinary Sciences, University of Munich, Munich, Germany

[‡] Current address: Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

* Birgit.Viertlboeck@lmu.de



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Turowski V, Sperling B, Hanczaruk MA, Göbel TW, Viertlboeck BC (2016) Chicken TREM-B1, an Inhibitory Ig-Like Receptor Expressed on Chicken Thrombocytes. *PLoS ONE* 11(3): e0151513. doi:10.1371/journal.pone.0151513

Editor: David Holowka, Cornell University, UNITED STATES

Received: July 9, 2015

Accepted: February 29, 2016

Published: March 11, 2016

Copyright: © 2016 Turowski et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grant V1459/2-2 www.dfg.de to BCV.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Triggering receptors expressed on myeloid cells (TREM) form a multigene family of immunoregulatory Ig-like receptors and play important roles in the regulation of innate and adaptive immunity. In chickens, three members of the TREM family have been identified on chromosome 26. One of them is TREM-B1 which possesses two V-set Ig-domains, an uncharged transmembrane region and a long cytoplasmic tail with one ITSM and two ITIMs indicating an inhibitory function. We generated specific monoclonal antibodies by immunizing a Balb/c mouse with a TREM-B1-FLAG transfected BWZ.36 cell line and tested the hybridoma supernatants on TREM-B1-FLAG transfected 2D8 cells. We obtained two different antibodies specific for TREM-B1, mab 7E8 (mouse IgG1) and mab 1E9 (mouse IgG2a) which were used for cell surface staining. Single and double staining of different tissues, including whole blood preparations, revealed expression on thrombocytes. Next we investigated the biochemical properties of TREM-B1 by using the specific mab 1E9 for immunoprecipitation of either lysates of surface biotinylated peripheral blood cells or stably transfected 2D8 cells. Staining with streptavidin coupled horse radish peroxidase revealed a glycosylated monomeric protein of about 50 kDa. Furthermore we used the stably transfected 2D8 cell line for analyzing the cytoplasmic tyrosine based signaling motifs. After per-vanadate treatment, we detected phosphorylation of the tyrosine residues and subsequent recruitment of the tyrosine specific protein phosphatase SHP-2, indicating an inhibitory potential for TREM-B1. We also showed the inhibitory effect of TREM-B1 in chicken thrombocytes using a CD107 degranulation assay. Crosslinking of TREM-B1 on activated primary thrombocytes resulted in decreased CD107 surface expression of about 50–70%.

Introduction

A balanced immune reaction is important to avoid either insufficient or exaggerated immune responses. Therefore the cells interact via a network of either activating or inhibitory signals,

which fine-tune the outcome of the immune response. Many of these cell-cell interactions are still poorly understood, but a group of so called immunoregulatory receptors are very likely to be involved in this process [1–3]. They are cell surface receptors with either activating or inhibitory signaling potential which are biochemically divided in two different groups and belong to either type II transmembrane C-type lectins [4] or type I transmembrane Ig-superfamily members [5]. Activating receptors have a short cytoplasmic tail without any signaling capabilities, but display a positively charged amino acid in the transmembrane region, which can be either arginine or lysine. This is associated with the negatively charged residue of an ITAM containing adaptor molecule, which is DAP12 or common γ chain. An ITAM is a so-called immunoreceptor-tyrosine based activating motif, which is phosphorylated after receptor crosslinking and triggers intracytoplasmic activation cascades [6, 7]. The inhibitory receptors have an uncharged transmembrane region, but a long cytoplasmic tail with a different number of immunoreceptor-tyrosine-based-inhibitory motifs (ITIMs). Interaction with the specific ligand leads to phosphorylation of these tyrosines and subsequent recruitment of tyrosine specific protein phosphatases like src-homology phosphatase-1 (SHP-1), SHP-2 or Src homology 2-containing inositol 5'-phosphatase (SHIP) which are dephosphorylating downstream target molecules [8, 9].

Immunoregulatory Ig-like receptors are also present in chickens. One family are the chicken Ig-like receptors (CHIR), which were discovered in 2000 [10] and characterized in recent years by us and other groups [11–18].

The availability of the first assembly of the chicken genome in 2004 [19] offered the opportunity to further investigate additional immunoregulatory Ig-like receptor families by extended homology searches. By this method, we characterized the TREM (triggering receptors expressed on myeloid cells), SIRP (signal-regulatory proteins), CD200R (CD200 receptor family) and CD300L (CD300 antigen like family members) [20–23].

The chicken TREM family is located on chicken chromosome 26. It comprehends of one potentially activating receptor TREM-A1 and two potentially inhibitory receptors TREM-B1 and TREM-B2 [20]. TREM-A1 consists of a single V-set Ig-domain, a charged transmembrane region and a short cytoplasmic tail. TREM-B1 and TREM-B2 both display two extracytoplasmic V-set Ig-domains, an uncharged transmembrane region and a long cytoplasmic tail. The cytoplasmic tail of TREM-B1 encodes for one ITSM (immunoreceptor-tyrosine switch motif) and two ITIMs, whereas TREM-B2 only has two ITIMs. Interestingly, for TREM-B2 we cloned two splice variants either with one or two extracellular Ig-domains followed by the transmembrane and cytoplasmic region [20]. At that time the chromosomal region encoding the TREM family members was still unassembled in the chicken genome. Meanwhile we analyzed a completely sequenced BAC clone which included all TREM members and the unrelated flanking genes, which we used, apart from other characteristics, for assigning synteny to corresponding mammalian receptors. This is *gallus gallus* BAC clone CH261-94J19 (Acc. No.: AC161468). In addition to our initial characterization, we found that the TREM-B2 gene displayed four extracytoplasmic V-set Ig-domains, which probably arose by duplication of a two domain receptor, because they were identical to each other by 97.4% on nucleotide level. We verified this third splice variant for TREM-B2 by cDNA cloning (Viertlboeck et al., unpublished).

Recently, we examined the expression pattern of the activating TREM-A1 by generating a specific monoclonal antibody (mab) [22]. We showed high TREM-A1 expression on blood and bone marrow monocytes, macrophages, heterophils (which are the avian homologues to neutrophils) and on a newly discovered population of blood NK cells [24]. Furthermore we detected lower TREM-A1 expression on thrombocytes and B and T cell subsets. Additionally,

we found TREM-A1 expression also in chicken brain cells, including microglial cells, neurons, astrocytes and oligodendrocytes.

In this report, we show detailed expression analysis of TREM-B1 employing two newly established mab. We found TREM-B1 to be expressed on chicken thrombocytes. Furthermore we used the specific mab to immunoprecipitate TREM-B1 protein from cell lysates of either PBMC or stably transfected 2D8 cells and we used this cell line to show that the tyrosine residues in the cytoplasmic region can be phosphorylated and recruit SHP-2. Moreover, we demonstrated that crosslinking of TREM-B1 resulted in a reduced surface expression of the degranulation marker CD107 on activated thrombocytes.

Materials and Methods

Ethics statement

All of the experimental procedures were in accordance with institutional, state and federal guidelines on animal welfare. The animal experiments were approved by the committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the Government of Upper Bavaria, Germany (permit number: 55.2-1-54-2531.6–12.09) and all efforts were made to minimize animal suffering during experiments.

Animals

Chicken line M11 was kindly provided by S. Weigend (Federal Research Institute for Animal Health, Mariensee, Germany). Fertilized Eggs were incubated and hatched at the Institute for Animal Physiology, University of Munich. The animals were housed under conventional conditions and experiments were performed at the age of 3 to 10 weeks. Balb/c mice were obtained from Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Germany) and raised at the institute.

Cell preparation

Leukocytes of chicken bursa, caecal tonsils, spleen and thymus were obtained by passing the organs through a stainless steel mesh and subsequent density centrifugation of the single cell suspension on Biocoll Separating Solution (Biochrom AG, Berlin, Germany). Heparinized whole blood was used to isolate either peripheral blood lymphocytes (PBL) by slow speed centrifugation [24] or peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by density centrifugation [25]. Preparation of monocyte-derived macrophages was performed by in vitro culture of PBMC in RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 8% FCS (Biochrom AG, Berlin, Germany) and 2% chicken serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 2 days (40°C, 5% CO₂) [26]. For whole blood analysis by flow cytometry, EDTA-treated blood was diluted in PBS supplemented with 1% BSA and 0.01% NaN₃.

Cloning procedures

The expression constructs established in this study were generated by using cDNA templates obtained in a previous study [20] and specific oligonucleotides are summarized in Table 1. For the TREM-B1-FLAG construct, primers 1791 and 1792 were used on a TREM-B1 cDNA (Acc. No.: AM076722). The resulting PCR fragments were gel extracted and coupled to a modified pcDNA3.1/V5-His TOPO Vector (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing an N-terminal FLAG epitope tag by using the Gibson Assembly™ Master Mix (New England BioLabs Inc., Massachusetts, USA). The TREM-B1-FLAG-muCD3 ζ expression construct was generated as the TREM-A1-FLAG-muCD3 ζ construct described previously [22]. Briefly, the respective extracellular domains were amplified by PCR with primers 1148 and 1149, gel purified and

Table 1. Oligonucleotides used for cloning.

Specificity	Number	Sequence ^b
TREM-B1-FLAG construct	1791s ^a	GGACGATGACGATAAGGCAGGAGAGGACACGCAAG
TREM-B1-FLAG construct	1792as	AGAATTGCCCTTGAACCTCTATAGGGTTGTGTCTCT
TREM-B1-FLAG –muCD3ζ	1148s	ATGAATTCGCAGGAGAGACACG
TREM-B1-FLAG –muCD3ζ	1149as	ATGAATTCAGCATAGGGGTCTCT
TREM-B2-FLAG –muCD3ζ	1748s	GGACGATGACGATAAGGGTCTCCAGCCCAAACAG
TREM-B2-FLAG –muCD3ζ	1749as	TGGATATCTGCAGAATTTGTGTATGGTTCCTCGTG

^aOrientation indicated as s sense and as antisense

^bRestriction site underlined

doi:10.1371/journal.pone.0151513.t001

EcoRI digested followed by ligation into a modified pcDNA3.1/V5-His TOPO Vector (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) resulting in an N-terminally FLAG-tagged extracellular region of TREM-B1 fused to the transmembrane region of chicken CD8α and the cytoplasmic domain of murine CD3ζ. For generation of the TREM-B2-FLAG-muCD3ζ construct, the same cloning vector was used, but ligation of the two extracellular Ig-domains, which were amplified by primers 1748 and 1748 on TREM-B2 cDNA (Acc. No.: AM076723), was performed with the Gibson Assembly™ Master Mix. Accuracy of the constructs was verified by gene sequencing (GATC, Konstanz, Germany).

Cell lines, transfection and expression

The mouse thymoma cell line BWZ.36 [27] was stably transfected by electroporation [28] using 25 μg of TREM-B1-FLAG-muCD3ζ (3 x 10⁶ cells, 200 V with 950 μF capacitance). Transfected cells were seeded into a 96-well flat bottom plate and selected in RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 10% FCS and 0.8 mg/ml G418 (Biochrom AG, Berlin, Germany) for 10 days (37°C, 5% CO₂). The chicken B cell line 2D8 [29] was stably transfected with a full-length TREM-B1-FLAG construct using Metafectene Pro (Biontix, Planegg, Germany). After incubation of 24 h (40°C, 5% CO₂) the transfected cells were plated in a 96-well flat bottom plate and cultured in RPMI medium containing 10% FCS and 0.8 mg/ml G418 (Biochrom AG, Berlin, Germany) for 2 weeks. Single clones were screened for surface expression by anti-FLAG staining and subsequent flow cytometry (FACSCanto II, BD, Heidelberg, Germany). A BWZ.36 cell line stably expressing TREM-A1-FLAG-muCD3ζ was established in a previous study [22]. In addition, human embryonic kidney HEK 293 T cells were transiently transfected with a TREM-B2-FLAG-muCD3ζ construct using the Metafectene liposomal transfection reagent (Biotex, Planegg, Germany) and used for further analysis after 24 h.

Real-time RT-PCR

RNA preparation and real-time RT-PCR was performed as described previously [22]. Total RNA of bursa, thymus, caecal tonsils, liver, spleen, bone marrow and PBMC was extracted from 100 mg tissue or 1 x 10⁷ cells by using Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The RNA quality was determined with the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and RNA with an integrity number above 7.5 was used for cDNA synthesis with the QuantiTect Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). PCR was performed with the PowerSYBR[®] Green RT-PCR Reagents Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) using the 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) with following parameters: 95°C for 10 min, then 40 cycles of 95°C for 15 s, and 59°C for 1 min

Table 2. Oligonucleotides used for real-time RT-PCR.

Specificity	Number	Sequence
TREM-B1	1060s ^a	ATTGGTCCTAACCGTGCCTGTGA
TREM-B1	1061as	ATGTGCCAGAATCCTCTTTTCG
18S rRNA	870s	CATGTCTAAGTACACACGGCGGTA
18S rRNA	871as	GCGCTCGTCGGCATGTATTA

^aOrientation indicated as s sense and as antisense

doi:10.1371/journal.pone.0151513.t002

with subsequent analysis by a melting curve. The cDNA samples were analyzed in triplicates with oligonucleotides specific for TREM-B1 and 18S rRNA (Table 2) obtaining the cycle thresholds (Ct) for each tissue. The relative amounts of gene-of-interest mRNA were calculated by means of the $\Delta\Delta C_t$ method as described before [21].

Generation of a specific monoclonal antibody

Two monoclonal antibodies with different isotypes were generated as described previously [11]. Briefly, a Balb/c mouse was repeatedly immunized with the TREM-B1-FLAG-muCD3 ζ transfected BWZ.36 cells. Hybridoma supernatants were screened by flow cytometry on TREM-B1-FLAG transfected 2D8 cells thereby excluding nonspecific mab binding to irrelevant BWZ.36 proteins. For additional verification of the mab specificities, the supernatants were also tested on the TREM-B1-FLAG-muCD3 ζ transfected BWZ.36 cells and on both untransfected BWZ.36 and 2D8 cells. Cross-reaction with other structurally similar TREM members was examined by staining TREM-A1-FLAG-muCD3 ζ transfected BWZ.36 and TREM-B2-FLAG-muCD3 ζ transfected 293T cells. For our further analysis of TREM-B1, we selected the mab 1E9 (mouse IgG2a) and 7E8 (mouse IgG1). For whole blood staining, the mab 1E9 was affinity purified by protein G coupled agarose, subsequently concentrated using centrifugal filters (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and conjugated to the Alexa Fluor 647 dye (Life Technologies GmbH-Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol.

Antibodies and immunofluorescence analysis

Single-cell staining was performed with either the 1E9 or the 7E8 mab followed by a goat-anti-mouse IgG2a- or IgG1-PE conjugate (SBA, Birmingham, AL, USA). For double staining of leukocytes, cells were first incubated with a mixture of primary mab. Depending on the isotype of the other mab in the mixture either the anti-TREM-B1 mab 1E9 (IgG2a) or 7E8 (IgG1) was used. Subsequently, cells were incubated with a combination of goat-anti-mouse IgG2a-PE and goat-anti-mouse IgG1-FITC (SBA, Birmingham, AL, USA) when the 1E9 mab was used or a mixture of goat-anti-mouse IgG2a-FITC and goat-anti-mouse IgG-1-PE when 7E8 was used for staining. Following mab were used for further characterization of TREM-B1 expressing cells: 8G8 (mouse IgG2a) specific for CLEC-2, which is expressed on thrombocytes [30], K1 (mouse IgG2a) recognizing an unidentified antigen expressed on thrombocytes and macrophages [31], AV20 (mouse IgG1) specific for Bu-1 present on B cells [32], CT3 (mouse IgG1) specific for CD3 on T cells [33], KUL01 (mouse IgG1) specific for monocytes and macrophages [34], 8F2 putatively recognizing a CD11c homologue expressed on chicken thrombocytes, T cells, NK cells, monocytes, heterophils and eosinophils [24] and 8D12 specific for a chicken Fc γ receptor (CHIR-AB1) expressed on B cells, monocytes and macrophages, NK cells and

heterophils [13, 22]. For each staining, appropriate isotype-matched controls were used. Dead cells were identified by staining with 7-AAD (7-aminoactinomycin D, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the vital leukocyte population was analyzed by flow cytometry (FACSCanto II, BD, Heidelberg, Germany) using the BD FACS DIVA 6.1.3 and FlowJo Software (Tree Star inc., Ashland, OR, USA). Whole blood staining was performed with the Alexa Fluor 647-conjugated 1E9 mab combined with a phycoerythrin-conjugated K1 mab [31] and analyzed by flow cytometry as described previously [35].

Biotinylation and pervanadate treatment of cells

Biotinylation and pervanadate treatment of cells were performed as described previously [11]. For biotinylation, 5×10^7 of TREM-B1 transfected 2D8 cells or 1×10^8 prepared PBMC were washed in PBS containing 1 mM $MgCl_2$ and 0.1 mM $CaCl_2$. After the cells were incubated in PBS with 0.5 mg/ml sulfo-NHS-biotin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 40 min at 4°C under constant rotation, the cells were washed once in RPMI 1640 followed by two washes in PBS with $MgCl_2$ and $CaCl_2$. Efficiency of biotinylation was checked by flow cytometry using phycoerythrin-conjugated streptavidin (SBA, Birmingham, AL, USA). Pervanadate treatment was conducted with 5×10^7 cells in 5 ml of warm (37°C) medium. After stimulation for 0, 5 and 15 min with 0.1 mM Na_3VO_4 with 0.05% H_2O_2 at 37°C, cells were immediately pelleted by centrifugation at 4°C and washed twice in cold (4°C) PBS containing 0.4 mM EDTA and 0.4 mM Na_3VO_4 . Subsequently, cells were lysed for 45 min on ice using a lysis buffer consisting of 150 mM NaCl, 40 mM TRIS-Cl pH 7.4 and 1 mM EDTA supplemented with 1% TritonX-100, the protease inhibitor cOmplete (Roche, Basel, Switzerland) and in case of pervanadate stimulation phosphatase inhibitors (10 mM NaF, 2 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4). Supernatant was separated from nuclear and insoluble components by centrifugation for 30 min at 4°C and 16,000 x g and subsequently used for immunoprecipitation.

Immunoprecipitation, deglycosylation and immunoblotting

Immunoprecipitation was performed with 50 μ l of either anti-Flag M2 Agarose Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or protein G-coupled agarose (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) loaded for 4 h with 1.5 μ g of the purified 1E9 mab and washed once with lysis buffer before use. Lysates were added to the agarose-beads and incubated over night at 4°C under constant rotation. The beads were washed three times in lysis buffer by centrifugation before immunoprecipitates were eluted by boiling the beads in 100 μ l of SDS sample buffer. For deglycosylation, immunoprecipitates were dissolved in a glycoprotein denaturing buffer followed by incubation in a buffer containing peptide N glycosidase F (PNGase, New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Precipitated proteins were separated on 12% SDS-PAGE under nonreducing and reducing conditions followed by transmission on a 0.45 μ m nitrocellulose membrane (Amersham Hybond-ECL, GE Healthcare, Solingen, Germany) by semidry electroblotting. The blots were blocked in 5% nonfat dry milk in PBS supplemented with 0.05% Tween and subsequently incubated with a streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) conjugate (1:10000, SBA, Birmingham, AL, USA), an anti-FLAG-POD (peroxidase) conjugate (1:20000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for loading control or a HRP conjugated anti-phosphotyrosine antibody (P-Tyr (Py20) HRP, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) for phosphotyrosine detection. Phosphatase detection was conducted by using a rabbit anti-human-SHP-2 antiserum (SH-PTP 2 (C-18), 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) followed by goat anti-rabbit IgG(H+L)-HRP (1:10000, Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA). Immunoblotted proteins were visualized using a luminol-based chemiluminescent substrate. This consists of three components:

ECL-A solution containing 0.1 M TRIS-HCl ad 100 ml aqua dest. pH 8.6 supplemented with 25 mg Luminol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ECL-B solution comprised of 0.110 g parahydroxy coumarin acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solved in 100 ml DMSO and ECL-C solution which is H₂O₂ 30% (v/v).

CD107 degranulation assay

To investigate the inhibitory potential of TREM-B1, the CD107 degranulation assay was performed [36]. 5 × 10⁵ PBMC were incubated simultaneously with the CLEC-2 specific mab 8G8 (mouse IgG2a) and the TREM-B1 specific mab 1E9 (mouse IgG2a), a goat-anti-mouse IgG2a-FITC conjugate (SBA, Birmingham, AL, USA) for co-crosslinking and the 5G10 mab detecting chicken CD107 (mouse IgG1, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) in the presence of the protein transport inhibitor GolgiStop™ (BD, Heidelberg, Germany). An appropriate isotype-matched control was performed identically, but in the presence of an irrelevant mouse IgG2a antibody instead of the 1E9 mab. Following incubation for 30 min (40°C, 5% CO₂), the cells were stained with an anti-IgG1-PE antibody (SBA, Birmingham, AL, USA). Dead cells were discriminated using 7-AAD (7-aminoactinomycin D, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and living cells were analyzed by flow cytometry. Additional controls without cross-linking were incubated in the absence of 8G8 and 1E9 or the irrelevant antibody and stained with the respective antibodies at the end of the experiment. To determine the percentage of TREM-B1 induced inhibition, the fraction of CD107 positive cells out of the whole thrombocyte population was calculated and referred to the isotype-matched control, which were set to 100% degranulation. Statistical analysis was performed by using Graph Pad Prism software version 5.

Results

The mab 1E9 and 7E8 are specific for TREM-B1 and do not cross-react with other TREM members

In order to generate a monoclonal antibody against the extracellular domain of TREM-B1, two different cell lines were established. Immunization was conducted with a TREM-B1-FLAG-muCD3 ζ transfected BWZ.36 cell line followed by screening of the hybridoma supernatants on chicken 2D8 cells stably expressing TREM-B1-FLAG (Fig 1). By this strategy, nonspecific mab detecting irrelevant BWZ.36 proteins were excluded. Two specific mab with different isotypes were selected, designated 1E9 (mouse IgG2a) and 7E8 (mouse IgG1). For validation of specificity, the obtained mab 1E9 and 7E8 were also tested on untransfected 2D8 and BWZ.36 cells as well as on TREM-B1-FLAG-muCD3 ζ transfected BWZ.36 cell line (Fig 1). Both antibodies bound to nearly all transfected cells, whereas unspecific binding to the untransfected control cells could be excluded.

To test whether the mab could cross-react with other members of the chicken TREM family, 1E9 and 7E8 supernatants were also tested on TREM-A1-FLAG-muCD3 ζ and TREM-B2-FLAG-muCD3 ζ transfected cells. Both mab reacted well with TREM-B1 (Fig 2A), but did not cross-react with the other TREM family members (Fig 2B and 2C). Surface expression of the respective proteins was validated by anti-FLAG staining.

TREM-B1 is expressed on thrombocytes

To investigate TREM-B1 protein expression, cell surface staining with the 7E8 mab on leukocyte preparations obtained from different tissues was conducted. Dead cells were stained with 7-AAD and excluded from the analysis. Lymphocytes from bursa, thymus and caecal tonsils

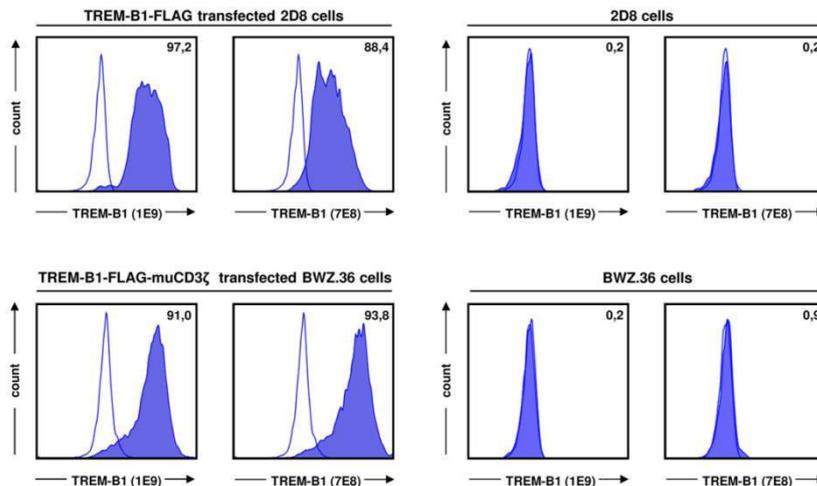


Fig 1. 1E9 and 7E8 are specifically recognizing TREM-B1 protein. TREM-B1-FLAG transfected 2D8 and untransfected 2D8 cells were incubated with either the 1E9 or the 7E8 mab (filled histograms) and analyzed by flow cytometry (upper panels). TREM-B1-FLAG-muCD3ζ transfected BWZ.36 and untransfected BWZ.36 cells were tested in the same way (lower panels). Isotype-matched controls are shown as open histograms and percentages of positive cells are indicated as numbers.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g001

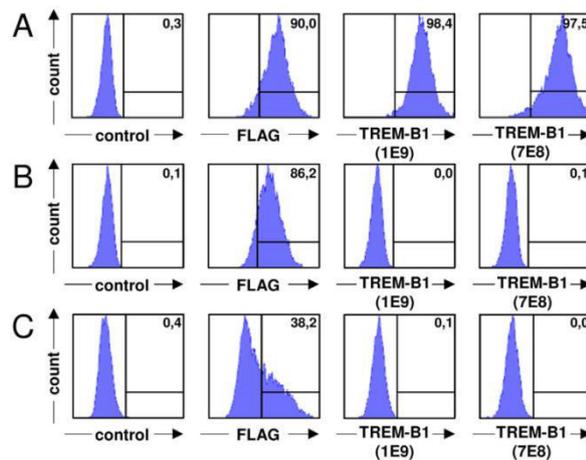


Fig 2. The mab 1E9 and 7E8 do not cross-react with other TREM family members. BWZ.36 cells stably expressing TREM-B1-FLAG-muCD3ζ (A) or TREM-A1-FLAG-muCD3ζ (B) and transiently transfected HEK-293T cells expressing TREM-B2-FLAG-muCD3ζ (C) were stained with an isotype-matched negative control (left panels), an anti-FLAG mab as expression control (middle panels, left) and the mab 1E9 (middle panels, right) and 7E8 (right panels). Numbers indicate the percentage of positive cells.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g002

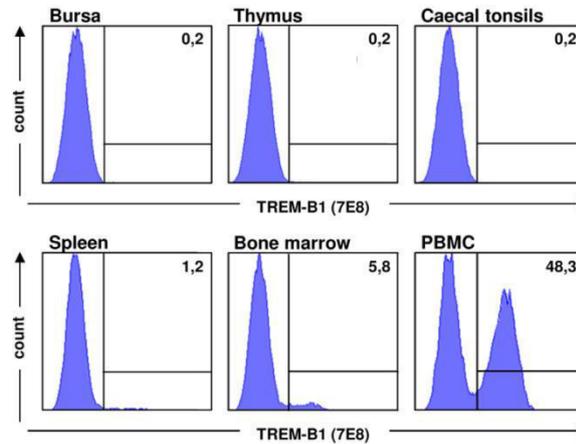


Fig 3. TREM-B1 is predominantly expressed on PBMC. Leukocytes obtained from bursa, thymus, caecal tonsils, spleen, bone marrow and blood (PBMC) were incubated with the 7E8 mab and analyzed by flow cytometry. The markers were set according to an isotype-matched negative control and the percentage of positive cells is indicated as a number. One of three representative experiments is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g003

showed no reactivity (Fig 3, upper panels). Only slight expression was found on cells from spleen and bone marrow and the highest expression was found on PBMC (Fig 3, lower panels), which is in accordance with real-time RT-PCR analysis (S1 Fig). Based on these results, double immunofluorescence staining on PBMC with antibodies specific for different cell populations was performed. Depending on the isotype of these antibodies, either the 1E9 or the 7E8 mab was applied. Living cells were identified by 7-AAD staining and either gated on lymphocytes/thrombocytes (R1), monocytes/NK cells (R2) or heterophils (R3) in FSC/SSC (Fig 4A). PBMC preparations of ten different animals were analyzed. Using the thrombocyte markers K1 or 8G8, all thrombocytes were found to be positive for TREM-B1 (Fig 4A, R1 gate, lower panels). The number of thrombocytes in the different preparations varied from 33.7% to 77.6%. In contrast, staining of lymphocytes (Fig 4A, R1 gate, upper panels), monocytes and NK cells (Fig 4A, R2 gate) and heterophils (Fig 4A, R3 gate) yielded no double positive population. Further analyses with the thrombocyte marker 23C6, the MHCII specific mab 2G11 and the 8C7 mab recognizing SLAMF4 (CD244) on thrombocytes, monocytes, NK cells and subsets of T cells and B cells, confirmed TREM-B1 expression is restricted to thrombocytes (data not shown).

To investigate the slight TREM-B1 expression on cells from spleen and bone marrow, these cells were also examined by double staining with the same antibody panel tested on PBMC (except 2G11 and 8C7). In compliance with PBMC staining, again thrombocytes were identified to be the only TREM-B1 expressing population (data not shown).

In addition, monocyte-derived macrophages were analyzed for TREM-B1 expression, but showed no reactivity (Fig 4B). In accordance with this, the chicken macrophage cell lines HD11 and BM-2 were also negative for TREM-B1 (data not shown).

Thrombocytes can be easily activated. In order to check the impact of cell density centrifugation on thrombocyte protein expression level of TREM-B1, whole blood was analyzed using the Alexa Fluor 647-conjugated 1E9 mab combined with a phycoerythrin-conjugated K1

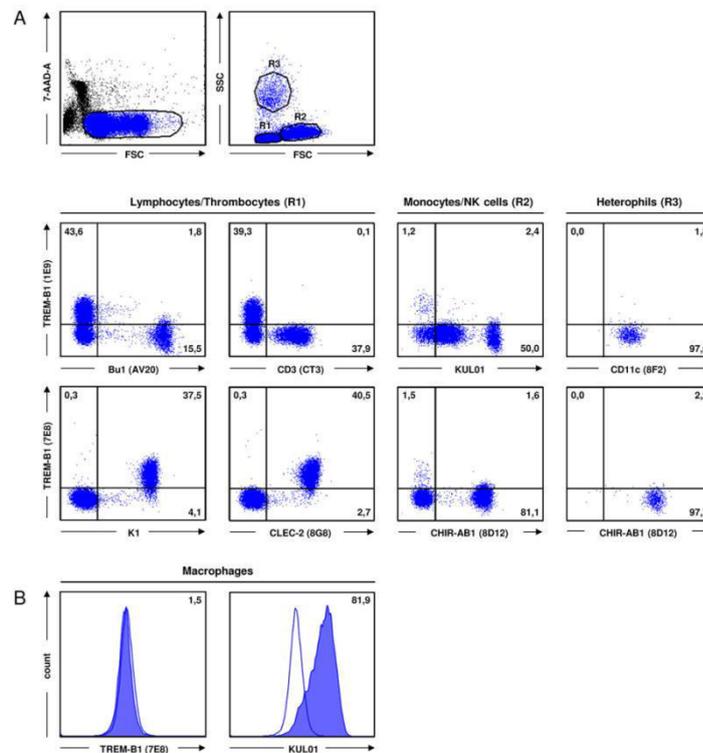


Fig 4. TREM-B1 is expressed on thrombocytes. (A) Viable PBMC were discriminated by 7-AAD staining and gated on lymphocytes/thrombocytes (R1), monocytes/NK cells (R2) or heterophils (R3) in FSC/SSC. Cells were double immunofluorescence stained with either the 1E9 (upper panel) or the 7E8 (lower panel) mAb in combination with several cell surface markers as indicated. Numbers indicate the percentage of cells in the respective quadrants. Isotype-matched controls were included in each experiment. One of ten representative experiments is shown. (B) Macrophages were single stained with the TREM-B1 specific mAb 7E9 and the macrophage/monocyte specific marker KUL01 (filled histograms). Isotype-matched controls are shown as open histograms and percentages of positive cells are indicated as numbers.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g004

antibody and compared with thrombocytes prepared by density centrifugation. The entire leukocyte population of both PBMC and whole blood was gated by their light scatter characteristics in FSC/SSC (Fig 5, upper panels) and analyzed by flow cytometry. However, there was no difference in TREM-B1 expression level (Fig 5, lower panels).

TREM-B1 is expressed as a glycosylated monomer

For biochemical analyses of TREM-B1, 2D8 cells expressing TREM-B1-FLAG were surface biotinylated, immunoprecipitated by the anti-TREM-B1 mAb 1E9 and an irrelevant isotype control and subsequently analyzed by western blot. Under non-reducing conditions, a protein

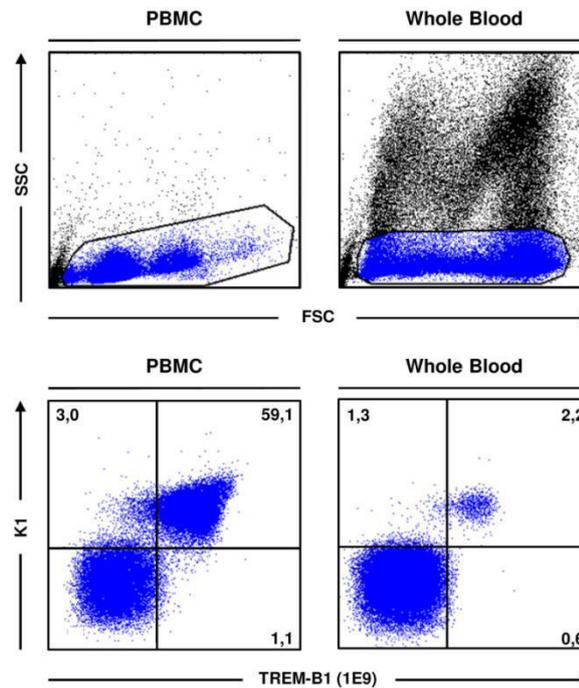


Fig 5. Cell preparation has no impact on the expression level of TREM-B1. PBMC obtained by density centrifugation and whole blood were double stained with the mab 1E9 and K1 (specific for monocytes and thrombocytes), gated on the entire leukocyte population by FSC/SSC and analyzed by flow cytometry. Numbers indicate the percentage of cells in the respective quadrants. The marker quadrants were set according to the unstained cells.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g005

band of approximately 50 kDa was detected by a streptavidin-HRP conjugate (Fig 6A). Reduction of the protein yielded a single band on the same level and the addition of PNGase F for deglycosylation resulted in a molecule band with a reduced M_R of about 45 kDa, which is in accordance with the theoretical M_R of 46 kDa (Fig 6A). Therefore, TREM-B1 seems to be expressed as a glycosylated monomer. Immunoprecipitates of the isotype control showed no detectable protein (data not shown).

We performed similar experiments on primary PBMC and detected the same protein bands for native TREM-B1 (Fig 6B).

TREM-B1 recruits SHP-2 upon phosphorylation

TREM-B1 contains three cytoplasmic signaling motifs, one ITSM and two ITIMs. Following phosphorylation, downstream signaling of the receptor might include protein phosphatases. Therefore, 2D8 cells expressing TREM-B1-FLAG were treated with pervanadate for 0, 5 and 15 minutes, respectively, and immunoprecipitated using anti-FLAG beads. The immunoblots

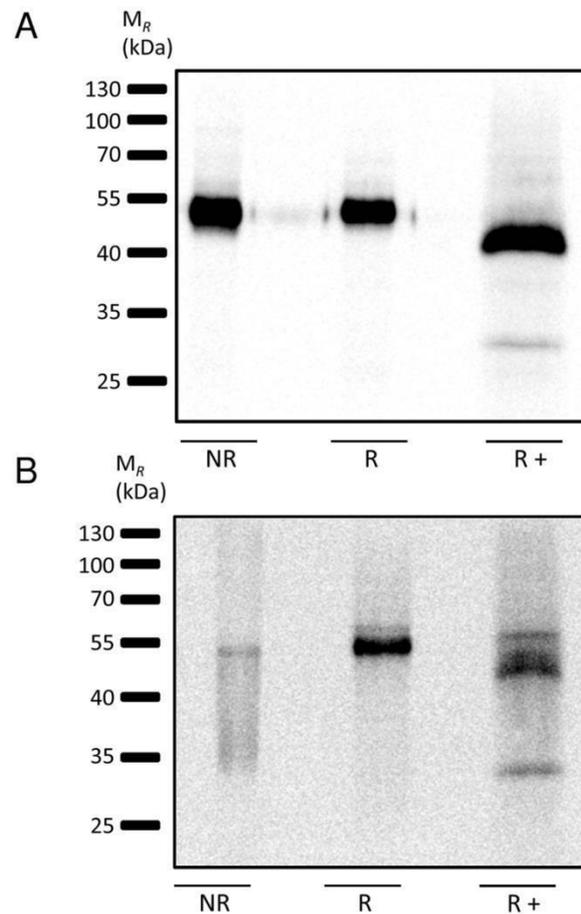


Fig 6. TREM-B1 is expressed as a glycosylated monomer. 2D8 cells stably transfected with a TREM-B1-FLAG construct (A) and PBMC (B) were surface biotinylated, lysed and immunoprecipitated with the 1E9 mAb. Deglycosylation was performed with PNGaseF (+) and probes were analyzed under nonreducing (NR) and reducing (R) conditions. Following PAGE, size-fractionated proteins were blotted and detected with a streptavidin-HRP conjugate.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g006

were probed with a monoclonal antibody detecting phosphotyrosine and an antiserum directed against SHP-2. Cells treated for 0 minutes showed a weak basal level of phosphorylated tyrosine residues as well as weak association with SHP-2 which increased after pervanadate treatment (Fig 7). Equal protein loading was proven by using an anti-FLAG-HRP conjugate for detecting TREM-B1 with an apparent mass of 50 kDa (Fig 7).

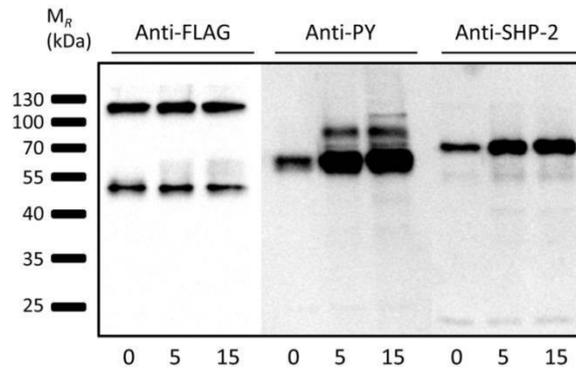


Fig 7. TREM-B1 recruits SHP-2 upon phosphorylation. TREM-B1-FLAG transfected 2D8 cells were treated with pervanadate for the times indicated, lysed and immunoprecipitated using an anti-FLAG mab. Indicated antibodies were used for detection of the proteins.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g007

TREM-B1 crosslinking reduces CLEC-2 induced thrombocyte degranulation

Further examination of the inhibitory properties of TREM-B1 was performed by using the CD107 degranulation assay. Chicken thrombocytes can be activated by CLEC-2 crosslinking, resulting in degranulation with cell surface expression of the lysosomal protein CD107 [30]. PBMC were co-incubated with the thrombocyte specific mab 8G8 and 1E9 in the presence of a crosslinking secondary mab and degranulation was monitored by using an antibody specific for CD107. Dead cells were stained with 7-AAD and excluded from the analysis. 30 minutes after co-crosslinking, CD107 expression on the entire thrombocyte population was decreased compared to the isotype-matched control (Fig 8A, right panels). Controls without crosslinking did only show a slight CD107 expression (Fig 8A, left panels). In five animals, the reduction ranged from 43.7% to 61.3% (Fig 8B). For example, in Fig 8A degranulation was reduced by 61.1%.

Discussion

Members of the TREM family have been the focus of intense research in the past years. Individual mammalian TREM receptors have been found to play a pivotal role in various functions and diseases including hemostasis and sepsis. The spectrum of different functions is not surprising, since the individual TREM receptors share only limited homology and each show a distinctive expression pattern [37, 38]. Apart from human and mouse TREM, this family of receptors has not been studied in great detail. Our analyses of chicken TREM aims to get a better understanding in the phylogeny of this receptor family and putatively conserved functions. It is therefore very important to characterize the expression pattern of individual chicken TREM receptors and to get insight into their functional potential. In this study, we generated TREM-B1 specific monoclonal antibodies to characterize cell surface expression patterns and biochemical properties. Combination of anti-TREM-B1 mab with a variety of different cell surface markers specific for chicken leukocyte subpopulations showed a TREM-B1 expression

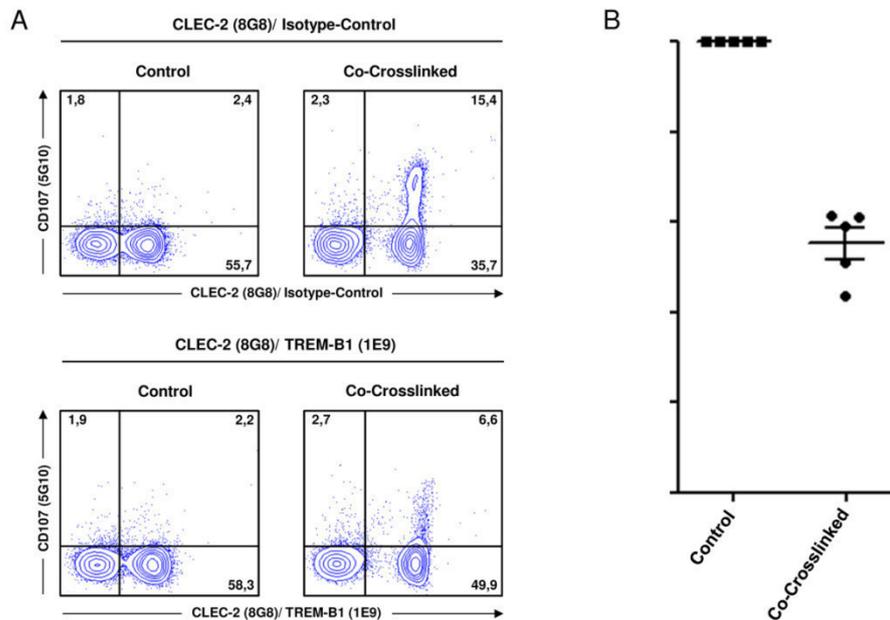


Fig 8. TREM-B1 crosslinking reduces CLEC-2 induced thrombocyte degranulation. (A) Co-crosslinking of CLEC-2 and TREM-B1 with the thrombocyte specific mab 8G8 and 1E9 decreased degranulation (lower panels) compared to co-crosslinking an irrelevant antibody and 8G8 (upper panels). Controls were incubated without crosslinking and subsequent stained with the respective antibodies. Numbers indicate the percentage of cells in the respective quadrants. One of five representative experiments is shown. (B) Percentage of TREM-B1 induced inhibition of CLEC-2 mediated thrombocyte degranulation. Markers represent single values of five different animals. Long bars represent the mean. Short bars represent the standard error of the mean (SEM).

doi:10.1371/journal.pone.0151513.g008

restricted to chicken thrombocytes. These thrombocytes were prepared by cell density gradient centrifugation from heparinized blood. To exclude unspecific activation of chicken thrombocytes using this separation method, which could potentially induce cell surface expression of TREM-B1, we also used whole blood preparation which implies a minimum of blood manipulation to exclude any accidental thrombocyte activation. Interestingly, we found no difference in expression levels comparing the two methods. Furthermore, we also stimulated purified thrombocytes with LPS to test potential up- or downregulation of TREM-B1 surface expression, but TREM-B1 expression levels were identical with or without stimulation (data not shown) indicating a constitutive expression of TREM-B1 on the cell surface of chicken thrombocytes.

The closest homologue to chicken TREM-B1 in mammals is the TREM-like transcript-1 (TLT-1), which is a member of the TREM multigene family on human chromosome 6p21 and mouse chromosome 17C [39–41]. It consists of a single V-set Ig-domain, an uncharged transmembrane region and a long cytoplasmic tail with one ITSM and one ITIM [42]. Whereas chicken thrombocytes display a constitutive TREM-B1 expression, mammalian platelets and megakaryocytes store TLT-1 in their α granules. TLT-1 surface expression can only be observed after platelet activation with thrombin, collagen or LPS [43, 44]. In 2009, fibrinogen

was identified as the natural ligand for TLT-1 and TLT-1 facilitated platelet aggregation, indicating a function in blood hemostasis [45].

Moreover, soluble TLT-1 was detected in supernatants of activated murine and human platelets [46]. It was also identified in human serum and plasma and correlated to disseminated intravascular coagulation scores during sepsis [45]. Subsequent investigations showed that soluble TLT-1 is involved in the inhibition of leukocyte activation during sepsis. As a decoy receptor it competes against TREM-1 for binding to its ligand. This reduces TREM-1 induced pro-inflammatory cytokine production of neutrophils [47]. Soluble TLT-1 could be thus of therapeutic use against sepsis associated inflammation by down regulating the effect of TREM-1 in the immune response.

Two different sources of soluble TLT-1 are discussed in the literature. There is an alternatively spliced variant of TLT-1, which encodes only for the extracellular domain [45], but soluble TLT-1 is also shed from the surface of activated platelets [46].

Currently, we are investigating the presence of a soluble TREM-B1 in chicken. We have some evidence that there is an alternatively spliced soluble variant. Moreover, we will also examine the presence of soluble TREM-B1 shed from the surface of thrombocytes.

In addition to the cell surface expression, the specific anti-TREM-B1 mab 1E9 was used for immunoprecipitation of TREM-B1 in both stable transfected TREM-B1-FLAG 2D8 cells and chicken PBMC containing many thrombocytes. Subsequent western blot analysis under non-reducing and reducing conditions and after deglycosylation showed that TREM-B1 is expressed as a glycosylated monomer. TREM-B1-FLAG 2D8 cells were further used to analyze the signaling capabilities of the cytoplasmic region of TREM-B1. There are three tyrosine residues, which are embedded in either an ITSM (TIYAAI) or two ITIMs (VMYVNI and VEYATL) [20]. Pervanadate treatment and subsequent western blot analysis showed that these tyrosine residues are phosphorylated and the tyrosine specific phosphatase SHP-2 is recruited (Fig 7). Similarly to these results, human TLT-1 has also one ITSM (TTYTSL) and on ITIM (VTYATV) [39], as does murine TLT-1 (ITSM: SIYTGGS, ITIM: VTYATV) [42]. Initial experiments showed recruitment of the tyrosine specific phosphatase SHP-1 indicating an inhibitory potential of the receptor [43]. Another group showed recruitment of SHP-2, which did not result in inhibition, but in an enhancement of Fc receptor mediated Ca⁺⁺ release in RBL cells [48] indicating coactivating potential of TLT-1. Furthermore, Washington et al showed an interaction of the cytoplasmic region of TLT-1 with cytoskeleton associated ERM proteins which would contribute to platelet aggregation [45].

Chicken thrombocytes and mammalian platelets differ in various aspects, in particular, since thrombocytes are nucleated cells. Little is known regarding their immune function but they react to LPS and express Toll like receptors [49–51]. Additionally, we and other groups demonstrated the expression of immune relevant cell surface receptor on chicken thrombocytes like CLEC-2, SLAMF4, TREM-A1, CD40L, CD200R-S1 and ggFCR [21, 22, 30, 52–54]. All these findings indicate that chicken thrombocytes might be involved in various types of immune responses.

We used the ability of CLEC-2 inducing degranulation of thrombocytes [30] for functional analysis of the potentially inhibitory TREM-B1. By this method we showed that co-crosslinking of TREM-B1 with CLEC-2 decreased thrombocyte degranulation by about 40–60%. This finding shows that TREM-B1 can act as a true inhibitory receptor.

As a next step to further reveal the TREM-B1 function on thrombocytes, we will focus on the identification of its natural ligand. For this purpose the TREM-B1 expressing reporter cell line BWZ.36 will be employed. This reporter assay has already been successfully used by our group in the identification of various ligands for different chicken Ig-like receptors [13, 23, 52, 55, 56].

In conclusion, analysis of the chicken TREM-B1 protein expression revealed expression on thrombocytes, which is similar to its mammalian homologue TLT-1. But chicken TREM-B1 is constitutively expressed on thrombocytes, while mammalian TLT-1 is only relocated to the cell surface upon platelet activation. Furthermore, TREM-B1 has been shown to inhibit thrombocyte degranulation. This may indicate a different physiological role of TREM-B1 on chicken thrombocytes.

Supporting Information

S1 Fig. TREM-B1 is highly expressed by PBMC. RNA from indicated tissues was analyzed for TREM-B1 expression by real-time RT-PCR using oligonucleotides summarized in Table 2. Cycle threshold values were normalized on 18S RNA and calibrated on liver using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula. One representative out of three experiments is shown. (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Dr. M.-L. Neulen for help and support with flow cytometric analyses and Dr. M. Zechmann and Dr. C. Straub for technical advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TWG BCV. Performed the experiments: VT BS MAH. Analyzed the data: VT TWG BCV. Wrote the paper: VT TWG BCV.

References

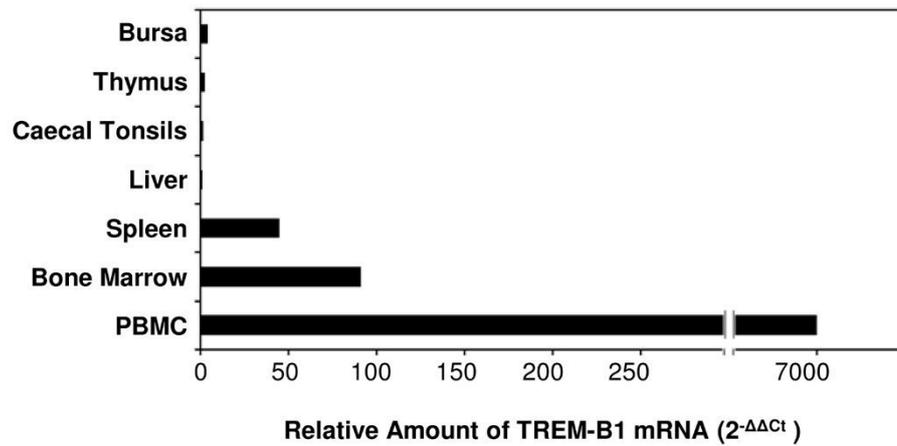
1. Barrow AD, Trowsdale J. The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunological Reviews*. 2008; 224:98–123. doi: [10.1111/j.1600-065X.2008.00653.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00653.x) PMID: 18759923
2. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science*. 2000; 290:84–9. PMID: 11021804
3. Zhu Y, Yao S, Chen L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity*. 2011; 34:466–78. doi: [10.1016/j.immuni.2011.04.008](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.04.008) PMID: 21511182
4. Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annual Review in Immunology*. 1993; 11:613–35.
5. Yamada E, McVicar DW. Paired receptor systems of the innate immune system. *Current Protocols in Immunology*. 2008; Chapter 1: Appendix 1X.
6. Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 1989; 338:383–4. PMID: 2927501
7. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011; 132:315–25. doi: [10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03398.x) PMID: 21214544
8. Rhee I, Veillette A. Protein tyrosine phosphatases in lymphocyte activation and autoimmunity. *Nature Immunology*. 2012; 13:439–47. doi: [10.1038/ni.2246](https://doi.org/10.1038/ni.2246) PMID: 22513334
9. Daeron M, Jaeger S, Du Pasquier L, Vivier E. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunological Reviews*. 2008; 224:11–43. doi: [10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00666.x) PMID: 18759918
10. Dennis G Jr., Kubagawa H, Cooper MD. Paired Ig-like receptor homologs in birds and mammals share a common ancestor with mammalian Fc receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2000; 97:13245–50.
11. Viertlboeck BC, Crooijmans RP, Groenen MA, Göbel TW. Chicken Ig-Like Receptor B2, a Member of a Multigene Family, Is Mainly Expressed on B Lymphocytes, Recruits Both Src Homology 2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and Inhibits Proliferation. *Journal of Immunology*. 2004; 173:7385–93.
12. Viertlboeck BC, Habermann FA, Schmitt R, Groenen MA, Du Pasquier L, Göbel TW. The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *Journal of Immunology*. 2005; 175:385–93.

13. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Hanczaruk MA, Schmitt R, Du Pasquier L, Herberg FW, 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; 104:11718–23.
14. Aron TI, Kaiser JT, West AP Jr., Olson R, Diskin R, Viertlboeck BC, et al. The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. *Journal of Molecular Biology*. 2008; 381:1012–24. doi: [10.1016/j.jmb.2008.06.082](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.082) PMID: [18625238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18625238/)
15. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Schmitt R, Herberg FW, Göbel TW. The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors. *Journal of Immunology*. 2009; 182:6985–92.
16. Viertlboeck BC, Gick CM, Schmitt R, Du Pasquier L, Göbel TW. Complexity of expressed CHIR genes. *Developmental and Comparative Immunology*. 2010; 34:866–73. doi: [10.1016/j.dci.2010.03.007](https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.03.007) PMID: [20347866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20347866/)
17. Viertlboeck BC, Gobel TW. The chicken leukocyte receptor cluster. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 144:1–10. doi: [10.1016/j.vetimm.2011.07.001](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.07.001) PMID: [21794927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21794927/)
18. Laun K, Coggill P, Palmer S, Sims S, Ning Z, Ragoussis J, et al. The leukocyte receptor complex in chicken is characterized by massive expansion and diversification of immunoglobulin-like Loci. *PLoS Genetics*. 2006; 2:e73. PMID: [16699593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16699593/)
19. Hillier LW, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison RC, Ponting CP, et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*. 2004; 432:695–716. PMID: [15592404](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15592404/)
20. Viertlboeck BC, Schmitt R, Göbel TW. The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L. *Immunogenetics*. 2006; 58:180–90. PMID: [16493555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16493555/)
21. Viertlboeck BC, Hanczaruk MA, Schmitt FC, Schmitt R, Göbel TW. Characterization of the chicken CD200 receptor family. *Molecular Immunology*. 2008; 45:2097–105. PMID: [18062907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18062907/)
22. Viertlboeck BC, Hanczaruk MA, Amann B, Bader SR, Schmitt R, Sperling B, et al. Chicken immunoregulatory Ig-like receptor families: an overview and expression details on ggTREM-A1. *Developmental and Comparative Immunology*. 2013; 41:403–12. doi: [10.1016/j.dci.2013.04.017](https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.017) PMID: [23648646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23648646/)
23. Sperling B, Viertlboeck BC, Gobel TW. Chicken CD300a homolog is found on B lymphocytes, various leukocytes populations and binds to phospholipids. *Developmental and Comparative Immunology*. 2015; 50:121–8. doi: [10.1016/j.dci.2015.02.004](https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.02.004) PMID: [25681077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25681077/)
24. Neulen ML, Viertlboeck BC, Straub C, Göbel TW. Identification of novel chicken CD4(+) CD3(-) blood population with NK cell like features. *Developmental and Comparative Immunology*. 2015; 49:72–8. doi: [10.1016/j.dci.2014.11.012](https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.11.012) PMID: [25445913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25445913/)
25. Viertlboeck BC, Göbel TW. Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007; 119:137–41. PMID: [17659354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17659354/)
26. Peck R, Murthy KK, Vainio O. Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs. *Journal of Immunology*. 1982; 129:4–5.
27. Karttunen J, Shastri N. Measurement of ligand-induced activation in single viable T cells using the lacZ reporter gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88:3972–6. PMID: [1902576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1902576/)
28. Iizuka K, Naidenko OV, Plougastel BF, Fremont DH, Yokoyama WM. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NCRP1 family of natural killer cell receptors. *Nature Immunology*. 2003; 4:801–7. PMID: [12858173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12858173/)
29. Puehler F, Göbel T, Breyer U, Ohnemus A, Staeheli P, Kaspers B. A sensitive bioassay for chicken interleukin-18 based on the inducible release of preformed interferon-gamma. *Journal of Immunological Methods*. 2003; 274:229–32. PMID: [12609548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12609548/)
30. Neulen ML, Göbel TW. Identification of a chicken CLEC-2 homologue, an activating C-type lectin expressed by thrombocytes. *Immunogenetics*. 2012; 64:389–97. doi: [10.1007/s00251-011-0591-z](https://doi.org/10.1007/s00251-011-0591-z) PMID: [22205394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22205394/)
31. Kaspers B, Lillehoj HS, Lillehoj EP. Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1993; 36:333–46. PMID: [8333143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8333143/)
32. Rothwell CJ, Vervelde L, Davison TF. Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1996; 55:225–34. PMID: [9014319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9014319/)
33. Chen CL, Ager LL, Gartland GL, Cooper MD. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *Journal of Experimental Medicine*. 1986; 164:375–80. PMID: [2425031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2425031/)
34. Mast J, Goddeeris BM, Peeters K, Vandesande F, Berghman LR. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998; 61:343–57. PMID: [9613446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9613446/)

35. Seliger C, Schaerer B, Kohn M, Pendl H, Weigend S, Kaspers B, et al. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2012; 145:86–99. doi: [10.1016/j.vetimm.2011.10.010](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.10.010) PMID: [22088676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22088676/)
36. Jansen CA, van de Haar PM, van Haarlem D, van Kooten P, de Wit S, van Eden W, et al. Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. *Developmental and Comparative Immunology*. 2010; 34:759–67. doi: [10.1016/j.dci.2010.02.009](https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.02.009) PMID: [20188123](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188123/)
37. Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Current Opinion in Immunology*. 2009; 21:38–46. doi: [10.1016/j.coi.2009.01.009](https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.009) PMID: [19230638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19230638/)
38. Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration. *Nature Immunology*. 2006; 7:1266–73. PMID: [17110943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17110943/)
39. Allcock RJ, Barrow AD, Forbes S, Beck S, Trowsdale J. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *European Journal of Immunology*. 2003; 33:567–77. PMID: [12645956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12645956/)
40. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Journal of Immunology*. 2000; 164:4991–5.
41. Daws MR, Lanier LL, Seaman WE, Ryan JC. Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family. *European Journal of Immunology*. 2001; 31:783–91. PMID: [11241283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11241283/)
42. Washington AV, Quigley L, McVicar DW. Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster. *Blood*. 2002; 100:3822–4. PMID: [12393607](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12393607/)
43. Washington AV, Schubert RL, Quigley L, Disipio T, Feltz R, Cho EH, et al. A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood*. 2004; 104:1042–7. PMID: [15100151](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15100151/)
44. Lu YT, Yen CY, Ho HC, Chen CJ, Wu MF, Hsieh SL. Preparation and characterization of monoclonal antibody against protein TREM-like transcript-1 (TLT-1). *Hybridoma (Larchmt)*. 2006; 25:20–6.
45. Washington AV, Gibot S, Acevedo I, Gattis J, Quigley L, Feltz R, et al. TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *Journal of Clinical Investigation*. 2009; 119:1489–501. doi: [10.1172/JCI36175](https://doi.org/10.1172/JCI36175) PMID: [19436112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19436112/)
46. Gattis JL, Washington AV, Chisholm MM, Quigley L, Szyk A, McVicar DW, et al. The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281:13396–403. PMID: [16505478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16505478/)
47. Derive M, Bouazza Y, Sennoun N, Marchionni S, Quigley L, Washington V, et al. Soluble TREM-like transcript-1 regulates leukocyte activation and controls microbial sepsis. *Journal of Immunology*. 2012; 188:5585–92.
48. Barrow AD, Astoul E, Floto A, Brooke G, Relou IA, Jennings NS, et al. Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2. *Journal of Immunology*. 2004; 172:5838–42.
49. St Paul M, Paolucci S, Barjesteh N, Wood RD, Schat KA, Sharif S. Characterization of chicken thrombocyte responses to Toll-like receptor ligands. *PLoS One*. 2012; 7:e43381. doi: [10.1371/journal.pone.0043381](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043381) PMID: [22916253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22916253/)
50. Ferdous F, Maurice D, Scott T. Broiler chick thrombocyte response to lipopolysaccharide. *Poultry Science*. 2008; 87:61–3. PMID: [18079451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18079451/)
51. Scott T, Owens MD. Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF-kappaB pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2. *Molecular Immunology*. 2008; 45:1001–8. PMID: [17825413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17825413/)
52. Straub C, Neulen ML, Viertlboeck BC, Göbel TW. Chicken SLAMF4 (CD244, 2B4), a receptor expressed on thrombocytes, monocytes, NK cells, and subsets of alpha-beta-, gamma-delta- T cells and B cells binds to SLAMF2. *Developmental and Comparative Immunology*. 2014; 42:159–68. doi: [10.1016/j.dci.2013.09.007](https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.09.007) PMID: [24055739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24055739/)
53. Tregaskes CA, Glansbeek HL, Gill AC, Hunt LG, Burnside J, Young JR. Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate. *Developmental and Comparative Immunology*. 2005; 29:361–74. PMID: [15859239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15859239/)
54. Viertlboeck BC, Schmitt R, Hanczaruk MA, Crooijmans RP, Groenen MA, Göbel TW. 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; 182:1533–40.

55. Zechmann M, Reese S, Gobel TW. Chicken CRTAM binds nectin-like 2 ligand and is upregulated on CD8+ alphabeta and gammadelta T lymphocytes with different kinetics. *PLoS One*. 2013; 8:e81942. doi: [10.1371/journal.pone.0081942](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081942) PMID: [24339981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24339981/)
56. Viertelboeck BC, Wortmann A, Schmitt R, Plachy J, Göbel TW. Chicken C-type lectin-like receptor B-NK, expressed on NK and T cell subsets, binds to a ligand on activated splenocytes. *Molecular Immunology*. 2008; 45:1398–404. PMID: [17950458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17950458/)

Supporting Information



S1 Fig. TREM-B1 is highly expressed by PBMC. RNA from indicated tissues was analyzed for TREM-B1 expression by real-time RT-PCR using oligonucleotides summarized in [Table 2](#). Cycle threshold values were normalized on 18S RNA and calibrated on liver using 2^{-ΔΔCt} formula. One representative out of three experiments is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0151513.s001

5 Diskussion

Dem Huhn kommt als Lebensmittel lieferndes Tier eine große Bedeutung zu. Die Erhaltung der Tiergesundheit spielt dabei eine zentrale Rolle, um zum einen die Geflügelindustrie vor wirtschaftlichen Verlusten zu schützen und zum anderen einen guten Verbraucherschutz zu gewährleisten. Ein möglicher Ansatzpunkt hierfür ist die gezielte Modulation des Immunsystems. Hierzu bedarf es jedoch eines tiefgründigen Verständnisses über den Aufbau und die Funktion des aviären Immunsystems, welches teilweise erhebliche Unterschiede zu dem des Säugers aufweist. Es besteht mittlerweile ein sehr gutes Grundlagenverständnis über das Immunsystem des Huhns. Die zusätzliche Identifizierung und Charakterisierung potentiell immunregulatorischer Rezeptorfamilien ist ein weiterer, notwendiger Schritt, um das erforderliche Wissen zu erweitern und zu vertiefen. Hierdurch wird eine Grundlage für die Einsicht in die Funktion und die Interaktion dieser Rezeptoren mit anderen Immunzellen geschaffen. Durch intensive Untersuchungen des Hühnergenoms konnten in den letzten Jahren verschiedene Mitglieder solcher Rezeptorfamilien identifiziert werden.

TREM-B1 ist ein potentiell hemmender Oberflächenrezeptor beim Haushuhn. Um einen Einblick in mögliche Funktionen des Rezeptors zu erlangen, wurde eine eingehende Charakterisierung des Expressionsmusters sowie der biochemischen und funktionellen Eigenschaften durchgeführt.

Durchflusszytometrische Expressionsanalysen mittels TREM-B1-spezifischer monoklonaler Antikörper ergaben, dass der Rezeptor ausschließlich auf Thrombozyten exprimiert ist. Zusätzlich zu diesen Untersuchungen, bei denen Leukozyten mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnen wurden, zeigten Vollblutfärbungen, dass die Zellpräparation keinen Einfluss auf die Expressionshöhe des Rezeptors ausübt. Auch die Stimulation angereicherter Thrombozyten mit LPS bewirkte keine Veränderung in der Oberflächenexpression (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst scheint TREM-B1 somit konstitutiv auf der

Oberfläche von Thrombozyten des Huhns exprimiert zu sein. Die biochemische Analyse des Rezeptors mittels Western Blot identifizierte TREM-B1 als ein glykosiliertes Monomer mit einem Molekulargewicht von 50 kDa. Bei Untersuchungen zur Signaltransduktion von TREM-B1 wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung des Rezeptors die Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 induziert. Eine weiterführende, funktionelle Analyse zeigte darüber hinaus, dass die Kreuzvernetzung des Rezeptors zu einer verminderten Oberflächenexpression des Degranulationsmarkers CD107 führt.

TREM-B1 weist in seiner Struktur und Aminosäuresequenz eine große Ähnlichkeit zum humanen TLT-1 auf [3]. Daher könnte es sich bei TREM-B1 um ein Homolog des TLT-1 beim Säuger handeln. Diese Hypothese wird durch einen Vergleich des Expressionsmusters der beiden Rezeptoren bestärkt. Genau wie TREM-B1 ist auch TLT-1 ausschließlich auf Thrombozyten exprimiert [78]. Außerdem weisen beide Rezeptoren strukturell ähnliche Merkmale auf, sie sind jedoch in ihrer Struktur nicht identisch. So hat TREM-B1 zwei Ig-Domänen vom V-Typ, während TLT-1 nur eine solche Domäne aufweist [40]. Auch in der Anzahl der Signalmotive unterscheiden sich die beiden Rezeptoren. Während TREM-B1 zwei ITIM und ein ITSM aufweist, besitzt TLT-1 neben dem ITSM nur ein ITIM [3, 40, 76]. Ein Sequenzvergleich zwischen der Membran-distalen Ig-Domäne von TREM-B1 mit der einzelnen Ig-Domäne von TLT-1 zeigte eine Übereinstimmung der Aminosäuren von 30 % (Abb. 6). Dies ist teilweise höher als die Homologie der einzelnen aviären TREM untereinander. Sowohl die humanen TREM Rezeptoren als auch die TREM Mitglieder des Huhns weisen nur eine geringe Menge übereinstimmender Aminosäuren in ihren Ig-Domänen auf [3, 13].

Des Weiteren konnte für TREM-B1 eine Assoziation mit dem Signalmolekül SHP-2 gezeigt werden. Auch für das humane TLT-1 wurde die Rekrutierung dieser Phosphatase nachgewiesen [76].

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass TREM-B1 und TLT-1 sich zwar in ihrer Struktur und Sequenz ähneln, sich aber nicht gleichen. Die Kongruenz des Expressionsmusters sowie die Signaltransduktion mittels

des gleichen Signalmoleküls SHP-2 deuten jedoch auf eine phylogenetische Verwandtschaft zwischen TREM-B1 des Haushuhns und TLT-1 des Säugers hin.

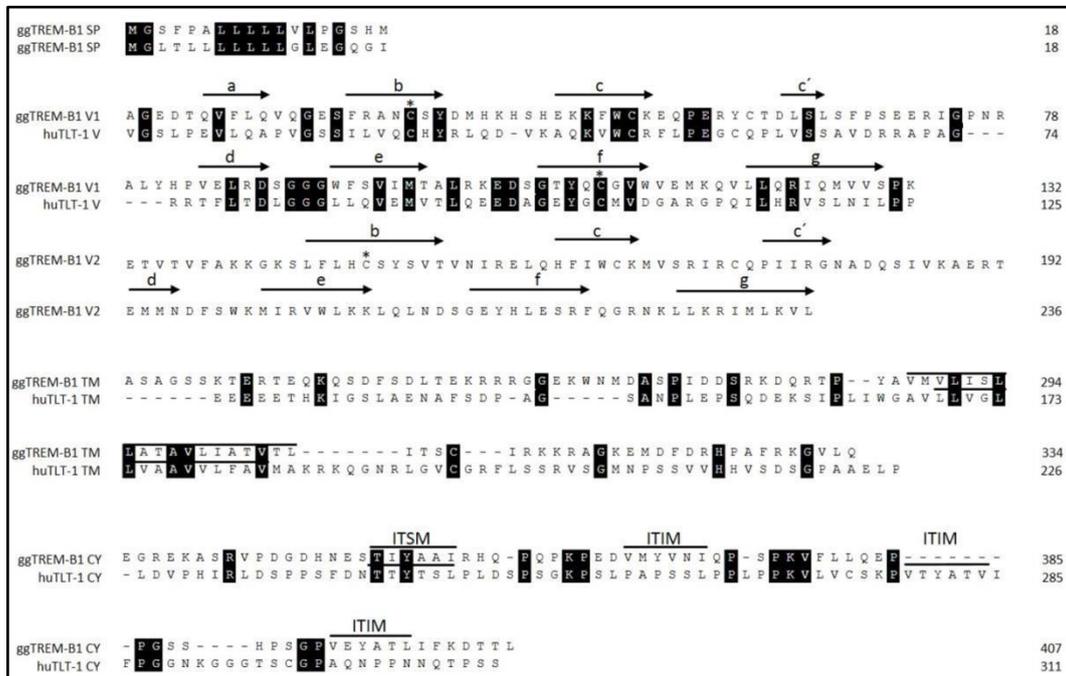


Abbildung 6: Sequenzvergleich zwischen TREM-B1 mit dem humanen TLT-1. Mit Hilfe des ClustalW Algorithmus wurden in Lasergene MegAlign die Proteinsequenzen der Signalpeptide (SP), der Ig-Domänen (V), der Transmembranbereiche (TM) und der zytoplasmatischen Domänen (CY) separat verglichen. Gleiche Aminosäuren sind schwarz schattiert. Der prognostizierte Transmembranbereich ist durch einen Strich und die β -Stränge der Ig-Domänen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Sterne deuten auf konservierte, Disulfidbrücken-bildende Cysteine hin.

Ein Ligand für TREM-B1 konnte bisher nicht identifiziert werden. Somit lässt sich auch über die Funktion des Rezeptors nur sehr vage spekulieren. TREM-B1 besitzt im zytoplasmatischen Bereich typisch hemmende Signalmotive. Mit zwei ITIM und einem ITSM weist dieses TREM Mitglied die typischen Merkmale eines inhibitorisch wirkenden Rezeptors der IgSF auf [3]. Auch die Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2 infolge einer Phosphorylierung des Rezeptors spricht für eine hemmende Funktion. Für TLT-1 wurde bei einer initialen Charakterisierung ebenfalls eine hemmende Funktion beschrieben [40]. Hier wurde allerdings zunächst gezeigt, dass die Phosphorylierung des Rezeptors zur Rekrutierung der Phosphatase SHP-1 führt. Dahingegen wurde in einer anderen Untersuchung zur Signaltransduktion nachgewiesen, dass nur SHP-2

rekrutiert wird [76]. Zudem kam diese Studie zu dem kontroversen Ergebnis, dass TLT-1 nicht wie ein typisch inhibitorischer Rezeptor die Kalzium-Freisetzung hemmt, sondern diese steigert. Dies weist somit vielmehr auf eine kostimulatorische als auf eine hemmende Funktion des Rezeptors hin. Für TREM-B1 konnte indessen ein inhibitorischer Effekt auf aktivierten Thrombozyten gezeigt werden. Eine Kreuzvernetzung des Rezeptors reduzierte die CLEC-2-induzierte Degranulation von Thrombozyten zwischen 43,7 % und 61,3 % und wies somit eine hemmende Wirkung von TREM-B1 nach.

Die Identifizierung eines Liganden für TLT-1 ist inzwischen gelungen [77]. Es konnte gezeigt werden, dass TLT-1 nach seiner Expression auf der Zelloberfläche Fibrinogen bindet, wodurch die Aggregation von Thrombozyten vermittelt wird. TLT-1 besitzt somit eine signifikante Rolle in der Blutgerinnung und der intravasalen Homöostase. Aufgrund der homologen Merkmale und des identischen Expressionsmusters auf Thrombozyten ist auch eine analoge Funktion von TLT-1 und TREM-B1 denkbar. Während die Expression von TLT-1 jedoch erst infolge einer Aktivierung der Thrombozyten induziert wird [78], konnte für TREM-B1 mittels Vollblutfärbungen eine konstitutive Expression nachgewiesen werden. Daher erscheint eine hämostatische Funktion eher unwahrscheinlich und weist auf eine andere physiologische Funktion von TREM-B1 hin. Es bleibt dabei zu beachten, dass Thrombozyten sehr leicht aktiviert werden können. Somit ist es möglich, dass selbst bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen von Vollblutproben bereits infolge minimaler Manipulationen, beispielsweise bei der Blutentnahme, eine Aktivierung stattgefunden hat. Initiale Untersuchungen zur Identifizierung eines TREM-B1 Liganden gaben keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen TREM-B1 und Fibrinogen (Daten nicht gezeigt). Die mögliche Bindung von Fibrinogen an TREM-B1 wurde mittels eines Reporter-gen-Assays überprüft. Für diese Versuche stand allerdings kein aviäres Fibrinogen zur Verfügung, so dass humanes Fibrinogen verwendet wurde. Zwar handelt es sich bei dem Protein um ein relativ konserviertes Molekül [88], trotzdem könnten aber Spezies-spezifische Unterschiede die Ursache für eine fehlende Interaktion zwischen dem Rezeptor und dem

potentiellen Liganden sein. Daher sollte zur Klärung dieser Fragestellung aviäres Fibrinogen verwendet werden.

Inhibitorische Ig-ähnliche Rezeptoren vermitteln ihre hemmende Wirkung in der Regel über die Unterbrechung einer aktivierenden Signalkaskade. Das heißt, sie besitzen für gewöhnlich einen aktivierenden Gegenspieler, dessen Signaltransduktion gehemmt wird. Man spricht hierbei auch von paarigen Ig-ähnlichen Rezeptoren. Dabei besitzen die antagonistisch wirkenden Rezeptoren nicht zwingend den gleichen Liganden. Bei gleichzeitiger Aktivierung entscheidet die Stärke der gegensätzlichen Signale, welche Wirkung überwiegt und ob somit ein aktivierender oder hemmender Effekt auf die Zellfunktion ausgeübt wird [23]. TREM-A1 ist unter den TREM Mitgliedern des Huhns der einzige potentiell aktivierende Rezeptor. Der Hypothese zufolge müsste TREM-B1 somit eine durch TREM-A1-induzierte Aktivierung hemmen oder aufheben. Diese Annahme ist jedoch unwahrscheinlich. Auch wenn TREM-A1 auf einer Subpopulation von Thrombozyten exprimiert ist [13], weisen die beiden Rezeptoren einen deutlichen Unterschied in ihrem Expressionsmuster auf. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass es neben TREM-A1 noch weitere aktivierende TREM Mitglieder gibt, die bisher aufgrund fehlender Homologie noch nicht identifiziert wurden. Wie zuvor erwähnt, besitzen die TREM Mitglieder untereinander nur eine geringe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. TREM-B1 könnte daher auch Gegenspieler für einen bisher unentdeckten, aktivierenden TREM Rezeptor sein. Letztendlich bleibt zu beachten, dass für das humane TLT-1 keine Hemmung von TREM-1 oder -2-induzierten Signalwegen beschrieben ist und der Rezeptor somit nicht in das typische Paradigma von paarigen Ig-ähnlichen Rezeptoren passt. Dies könnte auch für TREM-B1 zutreffen.

TREM-B1 ist ein potentiell immunregulatorischer Rezeptor. Seine restringierte Expression auf Thrombozyten weist daher auf eine mögliche Funktion von Thrombozyten im Immunsystem hin. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Thrombozyten nicht nur bei der Blutgerinnung von Bedeutung sind, sondern auch eine signifikante Rolle im Immungeschehen

spielen [89, 90]. Dies konnte auch schon für die Thrombozyten des Huhns gezeigt werden [91-93].

Im Säuger ist eine lösliche Form von TLT-1 bekannt (sTLT-1), für welche eine immunregulatorische Funktion nachgewiesen werden konnte [81]. Diese lösliche Rezeptorform wird durch aktivierte Thrombozyten vermutlich infolge von Hydrolyse sezerniert [45, 81]. Sie konnte im Serum, aber nicht im Plasma gesunder Individuen nachgewiesen werden [45]. Hingegen besitzen Sepsis-Patienten einen sehr hohen Plasmaspiegel von sTLT-1, welcher mit dem Schweregrad einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) korreliert [81]. sTLT-1 stellt somit einen potentiellen diagnostischen und/oder prognostischen Indikator für die DIC dar. Der Einsatz als diagnostischer Marker wurde indessen in der Literatur beschrieben [83]. Des Weiteren hemmt die lösliche Rezeptorform die TREM-1-induzierte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Anders als für hemmende Ig-Rezeptoren üblich, geschieht dies nicht über die Hemmung der TREM-1 vermittelten Signalgebung, sondern über die Konkurrenz um den gleichen Liganden. Bei einer Analyse der extrazellulären Domäne von TLT-1 wurde eine Sequenz von 17 Aminosäuren identifiziert, welche ein strukturelles Äquivalent zu einem Proteinbereich im murinen TREM-1 darstellt. Auch von TREM-1 existiert eine lösliche Form (sTREM-1), von der bekannt ist, dass sie die Signaltransduktion von membrangebundenen TREM-1 hemmt [43]. Diese Wirkung konnte auch für die lösliche Form von TLT-1 nachgewiesen werden. Dabei scheint sTLT-1, genau wie sTREM-1, mit dem membrangebundenen TREM-1 um seinen Liganden zu konkurrieren und hierdurch dessen Aktivität zu modulieren.

Für TREM-B1 konnte bisher noch keine lösliche Form nachgewiesen werden. Jedoch wurden in dem Gen des Rezeptors zwei potentielle Polyadenylierungssequenzen (Poly-A-Sequenz) identifiziert, welche beide im Intron hinter der ersten Ig-Domäne von TREM-B1 liegen. Nachfolgend wurde cDNA aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes synthetisiert und mittels PCR auf die Expression dieser Splice-Varianten untersucht. Hierbei konnte eine Splice-Variante (TREM-B1sp) mit einer Länge von

171 Aminosäuren nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden Zellen mit einem Expressionskonstrukt transfiziert, welches für die FLAG-markierte Splice-Variante kodiert. Eine intrazelluläre Expression konnte durch Immunfärbung gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Damit ist zwar die Expression des Proteins nachgewiesen, ob TREM-B1sp von den Thrombozyten sezerniert wird und ob diese Form des Rezeptors eine Funktion besitzt, bleibt jedoch noch zu klären. Die Prämisse einer potentiell biologischen Funktion dieser Splice-Variante wird dennoch durch das Vorkommen von zwei TLT-1 Splice-Varianten im Säuger unterstützt [76, 77], auch wenn hier die Rolle dieser Rezeptorform ebenfalls noch im Unklaren ist. Bei dem immunmodulatorischen sTLT-1 handelt es sich vermutlich nicht um eine solche Splice-Variante, sondern um ein Produkt hydrolytischer Spaltung [45, 81].

Untersuchungen zur Identifizierung einer löslichen Form (sTREM-B1) sowie eine weitere Charakterisierung von TREM-B1sp werden angestrebt. Hierzu sollen zunächst angereicherte Thrombozyten mit LPS stimuliert und anschließend der Überstand im Western Blot auf eine mögliche lösliche Form von TREM-B1 untersucht werden. Für diesen Zweck wurde bereits ein polyklonales Kaninchen-Antiserum hergestellt, welches gegen die extrazelluläre Domäne von TREM-B1 gerichtet ist und derzeit für Western Blot Analysen etabliert wird. Im Falle eines positiven Ergebnisses soll nachfolgend das Blut von LPS-behandelten Hühnern auf die lösliche Form untersucht und mit dem von Kontrolltieren verglichen werden. Ein übergeordnetes Ziel ist hierbei, TREM-B1 auf seine Eignung als Sepsismarker zu überprüfen. Ein zuverlässiger diagnostischer Sepsismarker wäre in der Bestandsbetreuung von Hühnern von großem Wert. Die frühzeitige und eindeutige Diagnose einer generalisierten Infektionskrankheit könnte durch eine schnelle therapeutische Intervention vor wirtschaftlichen Verlusten schützen.

Außerdem soll überprüft werden, ob TREM-B1sp von den Thrombozyten sezerniert wird oder ob diese Form nur intrazellulär nachzuweisen ist. Hierzu soll der Überstand von transfizierten Zellen, die die FLAG-markierte

Splice-Variante exprimieren, im Western Blot auf das Vorkommen von TREM-B1sp getestet werden.

Beim Säuger sind zahlreiche *TREM-like Transcripts* (TLT, auch TREML) bekannt. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrem Expressionsmuster zum Teil erheblich und besitzen somit auch sehr unterschiedliche Funktionen. Beim Huhn wurden hingegen nur zwei TLT identifiziert. Es ist möglich, dass die beiden Rezeptoren die Funktionen verschiedener TLT des Säugers kombinieren. Dies wird auch für den Rezeptor TREM-A1 diskutiert, der beim Huhn das einzige aktivierende Mitglied der TREM Familie darstellt. Es ist beschrieben worden, dass TREM-A1 sowohl die Sequenzmerkmale als auch das Expressionsmuster verschiedener TREM Mitglieder des Säugers kombiniert [13]. Somit könnten auch die unterschiedlichen Funktionen dieser Proteine in TREM-A1 vereint sein. Auch die anderen Rezeptoren der TREM Familie des Huhns könnten eine solche funktionelle Vereinigung in sich bergen. Dennoch besteht eine weitere Möglichkeit darin, dass andere Rezeptoren des Huhns die Funktionen fehlender Gene übernehmen.

Die initiale Charakterisierung von TREM-B1 stellt den Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen zur Funktion des Rezeptors dar. Die Identifizierung eines Liganden mittels eines Reporter-gen-Assays könnte hierzu maßgeblich beitragen.

6 Zusammenfassung

Charakterisierung von TREM-B1: ein hemmender Rezeptor auf Thrombozyten des Haushuhns

TREM-B1 ist ein potentiell immunregulatorischer Oberflächenrezeptor des Haushuhns. Der Rezeptor besitzt zwei Ig-Domänen vom V-Typ, einen ungeladenen Transmembranbereich sowie zwei ITIM und ein ITSM in der zytoplasmatischen Region. Mit diesen strukturellen Merkmalen und den typisch inhibitorischen Signalmotiven besitzt er die charakteristischen Eigenschaften eines hemmenden Ig-ähnlichen Rezeptors. Die TREM Familie umfasst beim Huhn drei Mitglieder und ist auf Chromosom 26 lokalisiert. Neben TREM-B1 konnte der potentiell aktivierende Rezeptor TREM-A1 und der potentiell hemmende Rezeptor TREM-B2 identifiziert werden. Sequenz- und Strukturmerkmale weisen darauf hin, dass TREM-B1 ein Homolog des humanen TLT-1 darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Expressionsmuster, die biochemischen und funktionellen Eigenschaften sowie die intrazelluläre Signaltransduktion von TREM-B1 eingehend untersucht. Zu diesem Zweck wurden TREM-B1-spezifische monoklonale Antikörper hergestellt und anschließend dazu verwendet, die Proteinexpression auf Leukozyten verschiedener Gewebe zu analysieren. Durch die Kombination mit spezifischen Markern für unterschiedliche Zellpopulationen konnte gezeigt werden, dass TREM-B1 ausschließlich auf Thrombozyten exprimiert wird. Darüber hinaus ergab die Untersuchung verschiedener Aktivierungsstadien von Thrombozyten, dass der Rezeptor, im Gegensatz zum TLT-1, konstitutiv auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

Biochemische Untersuchungen mittels Western Blot ergaben, dass TREM-B1 mit einem Molekulargewicht von 50 kDa als glykosiliertes Monomer auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert wird. Die Pervanadat-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors führte zur Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-2. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Kreuzvernetzung von TREM-B1 auf aktivierten

Thrombozyten zu einer Abnahme der Oberflächenexpression des Degranulationsmarkers CD107 führt.

Ein Ligand für TREM-B1 konnte bisher noch nicht identifiziert werden und auch die Funktion des Rezeptors ist derzeit noch gänzlich ungeklärt. Die drei typisch inhibitorischen Signalmotive sowie die Assoziation des Rezeptors mit SHP-2 und die TREM-B1-induzierte Hemmung der Degranulation von Thrombozyten lassen auf eine inhibitorische Funktion schließen. Eine zu TLT-1 analoge Aufgabe in der Blutgerinnung durch Interaktion mit Fibrinogen ist aufgrund der konstitutiven Oberflächenexpression von TREM-B1 unwahrscheinlich.

Zusammengenommen handelt es sich bei TREM-B1 um einen Rezeptor, der konstitutiv auf Thrombozyten des Huhns exprimiert ist und einen hemmenden Effekt auf die Degranulation aktivierter Thrombozyten ausübt.

7 Summary

Characterization of TREM-B1: an inhibitory receptor on chicken thrombocytes

TREM-B1 in chickens is a potential immunoregulatory cell surface receptor. The receptor possesses two V-set Ig-domains, an uncharged transmembrane region and a cytoplasmic tail bearing two ITIM and one ITSM. These structural features and the typically inhibitory motifs define TREM-B1 as a representative inhibitory Ig-like receptor. The chicken TREM family, located on chromosome 26, comprises three members. In addition to TREM-B1, the potential activating receptor TREM-A1 and the potential inhibitory receptor TREM-B2 were identified. Sequence and structural properties indicate TREM-B1 might be a homologue to human TLT-1.

In this study, TREM-B1 was characterized by detailed analyses of expression pattern, biochemical and functional features and intracellular signaling capabilities. For this purpose, TREM-B1 specific antibodies were generated and used to analyze protein expression on leukocytes obtained from different tissues. Combination with markers specific for different cell populations showed a TREM-B1 cell surface expression restricted to thrombocytes. In contrast to TLT-1, analysis of different activation stages of thrombocytes revealed a constitutive expression of TREM-B1 on the cell surface.

Biochemical investigations by western blot demonstrated that TREM-B1 is expressed as a glycosylated monomeric protein of 50 kDa. Pervanadate treatment resulted in phosphorylation of the receptor and subsequent recruitment of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. Moreover, TREM-B1 crosslinking has been shown to decrease cell surface expression of the degranulation marker CD107 on activated thrombocytes.

A ligand of TREM-B1 has not been identified yet and functions of the receptor are still unresolved. Three typically inhibitory motifs as well as association with SHP-2 and TREM-B1 induced reduction of thrombocyte

degranulation suggest an inhibitory function of the receptor. Unlike TLT-1, TREM-B1 is constitutively expressed. Therefore, the receptor seems to have a function different from TLT-1, which facilitates hemostasis through interaction with fibrinogen.

In summary, these findings show that TREM-B1 is a constitutively expressed receptor on chicken thrombocytes with an inhibitory effect on degranulation of activated thrombocytes.

8 Literaturverzeichnis

1. Bouchon, A., J. Dietrich, and M. Colonna, *Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 4991-5.
2. Dennis, G., Jr., H. Kubagawa, and M.D. Cooper, *Paired Ig-like receptor homologs in birds and mammals share a common ancestor with mammalian Fc receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13245-50.
3. Viertlboeck, B.C., R. Schmitt, and T.W. Gobel, *The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L*. Immunogenetics, 2006. **58**(2-3): p. 180-90.
4. Viertlboeck, B.C., et al., *Characterization of the chicken CD200 receptor family*. Mol Immunol, 2008. **45**(7): p. 2097-105.
5. Viertlboeck, B.C., et al., *Chicken Ig-like receptor B2, a member of a multigene family, is mainly expressed on B lymphocytes, recruits both Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and inhibits proliferation*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7385-93.
6. 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.
7. Viertlboeck, B.C., et al., *The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(28): p. 11718-23.
8. 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.
9. 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.
10. Viertlboeck, B.C., et al., *Complexity of expressed CHIR genes*. Dev Comp Immunol, 2010. **34**(8): p. 866-73.
11. Viertlboeck, B.C. and T.W. Gobel, *The chicken leukocyte receptor cluster*. Vet Immunol Immunopathol, 2011. **144**(1-2): p. 1-10.
12. 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.
13. Viertlboeck, B.C., et al., *Chicken immunoregulatory Ig-like receptor families: an overview and expression details on ggTREM-A1*. Dev Comp Immunol, 2013. **41**(3): p. 403-12.
14. Sperling, B., B.C. Viertlboeck, and T.W. Gobel, *Chicken CD300a homolog is found on B lymphocytes, various leukocytes populations and binds to phospholipids*. Dev Comp Immunol, 2015. **50**(2): p. 121-8.
15. Hanczaruk, M.A., *Die immunregulatorischen Trigger-Rezeptoren auf myeloiden Zellen (TREM) beim Haushuhn*. Dissertation, 2008: München.
16. Williams, A.F. and A.N. Barclay, *The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 381-405.

17. Harpaz, Y. and C. Chothia, *Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains*. J Mol Biol, 1994. **238**(4): p. 528-39.
18. Allcock, R.J., et al., *The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44*. Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 567-77.
19. Tomasello, E., et al., *Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells*. Semin Immunol, 2000. **12**(2): p. 139-47.
20. Wu, J., et al., *DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1059-68.
21. Gergely, J., I. Pecht, and G. Sarmay, *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells*. Immunol Lett, 1999. **68**(1): p. 3-15.
22. Campbell, K.S. and M. Colonna, *Human natural killer cell receptors and signal transduction*. Int Rev Immunol, 2001. **20**(3-4): p. 333-70.
23. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
24. Shlapatska, L.M., et al., *CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5480-7.
25. Dong, Z., et al., *The adaptor SAP controls NK cell activation by regulating the enzymes Vav-1 and SHIP-1 and by enhancing conjugates with target cells*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 974-85.
26. Zhao, F., et al., *Positive and negative signaling through SLAM receptors regulate synapse organization and thresholds of cytolysis*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 1003-16.
27. Kageyama, R., et al., *The receptor Ly108 functions as a SAP adaptor-dependent on-off switch for T cell help to B cells and NKT cell development*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 986-1002.
28. Veillette, A., et al., *Importance and mechanism of 'switch' function of SAP family adaptors*. Immunol Rev, 2009. **232**(1): p. 229-39.
29. Daws, M.R., et al., *Cloning and characterization of a novel mouse myeloid DAP12-associated receptor family*. Eur J Immunol, 2001. **31**(3): p. 783-91.
30. Paradowska-Gorycka, A. and M. Jurkowska, *Structure, expression pattern and biological activity of molecular complex TREM-2/DAP12*. Hum Immunol, 2013. **74**(6): p. 730-7.
31. Cantoni, C., et al., *NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily*. J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 787-96.
32. Cella, M., et al., *A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity*. Nature, 2009. **457**(7230): p. 722-5.
33. Spits, H., et al., *Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 145-9.

34. Bouchon, A., et al., *TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1103-7.
35. Ford, J.W. and D.W. McVicar, *TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(1): p. 38-46.
36. Genua, M., et al., *The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) in inflammatory bowel disease pathogenesis*. *J Transl Med*, 2014. **12**: p. 293.
37. Schmid, C.D., et al., *Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia*. *J Neurochem*, 2002. **83**(6): p. 1309-20.
38. Chung, D.H., W.E. Seaman, and M.R. Daws, *Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(1): p. 59-66.
39. Watarai, H., et al., *PDC-TREM, a plasmacytoid dendritic cell-specific receptor, is responsible for augmented production of type I interferon*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(8): p. 2993-8.
40. Washington, A.V., L. Quigley, and D.W. McVicar, *Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster*. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3822-4.
41. King, R.G., B.R. Herrin, and L.B. Justement, *Trem-like transcript 2 is expressed on cells of the myeloid/granuloid and B lymphoid lineage and is up-regulated in response to inflammation*. *J Immunol*, 2006. **176**(10): p. 6012-21.
42. Hemmi, H., et al., *A new triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family member, Trem-like 4, binds to dead cells and is a DNAX activation protein 12-linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells*. *J Immunol*, 2009. **182**(3): p. 1278-86.
43. Gibot, S., et al., *A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis*. *J Exp Med*, 2004. **200**(11): p. 1419-26.
44. Knapp, S., et al., *Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7131-4.
45. Gattis, J.L., et al., *The structure of the extracellular domain of triggering receptor expressed on myeloid cells like transcript-1 and evidence for a naturally occurring soluble fragment*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13396-403.
46. Gomez-Pina, V., et al., *Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes*. *J Immunol*, 2007. **179**(6): p. 4065-73.
47. Piccio, L., et al., *Identification of soluble TREM-2 in the cerebrospinal fluid and its association with multiple sclerosis and CNS inflammation*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 11): p. 3081-91.
48. Yoon, S.H., et al., *TLT-1s, alternative transcripts of triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript-1 (TLT-1), Inhibits the triggering receptor expressed on myeloid cell-2 (TREM-2)-mediated signaling pathway during osteoclastogenesis*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(35): p. 29620-6.
49. Gibot, S., et al., *Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(5): p. 451-8.

50. Gibot, S., et al., *Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis*. *Ann Intern Med*, 2004. **141**(1): p. 9-15.
51. Gibot, S. and A. Cravoisy, *Soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 as a marker of microbial infection*. *Clin Med Res*, 2004. **2**(3): p. 181-7.
52. Allaouchiche, B. and E. Boselli, *Soluble TREM-1 and the diagnosis of pneumonia*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(18): p. 1904-5; author reply 1904-5.
53. Siranovic, M., et al., *Human soluble TREM-1: lung and serum levels in patients with bacterial ventilator associated pneumonia*. *Acta Clin Croat*, 2011. **50**(3): p. 345-9.
54. Su, L., et al., *Value of soluble TREM-1, procalcitonin, and C-reactive protein serum levels as biomarkers for detecting bacteremia among sepsis patients with new fever in intensive care units: a prospective cohort study*. *BMC Infect Dis*, 2012. **12**: p. 157.
55. Horst, S.A., et al., *Prognostic value and therapeutic potential of TREM-1 in Streptococcus pyogenes- induced sepsis*. *J Innate Immun*, 2013. **5**(6): p. 581-90.
56. Chen, L.C., et al., *Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia*. *Exp Mol Pathol*, 2008. **84**(2): p. 145-55.
57. Rigo, I., et al., *Induction of triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-1) in airway epithelial cells by 1,25(OH)(2) vitamin D(3)*. *Innate Immun*, 2012. **18**(2): p. 250-7.
58. Schmausser, B., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) expression on gastric epithelium: implication for a role of TREM-1 in Helicobacter pylori infection*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **152**(1): p. 88-94.
59. Gingras, M.C., H. Lapillonne, and J.F. Margolin, *TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development*. *Mol Immunol*, 2002. **38**(11): p. 817-24.
60. Roe, K., S. Gibot, and S. Verma, *Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1): a new player in antiviral immunity?* *Front Microbiol*, 2014. **5**: p. 627.
61. Sharif, O. and S. Knapp, *From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection*. *Immunobiology*, 2008. **213**(9-10): p. 701-13.
62. Radaev, S., et al., *Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1*. *Structure*, 2003. **11**(12): p. 1527-35.
63. Bleharski, J.R., et al., *A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response*. *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3812-8.
64. Netea, M.G., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) amplifies the signals induced by the NACHT-LRR (NLR) pattern recognition receptors*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(6): p. 1454-61.
65. Radsak, M.P., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival*. *J Immunol*, 2004. **172**(8): p. 4956-63.

66. Pierobon, D., et al., *Chronic hypoxia reprograms human immature dendritic cells by inducing a proinflammatory phenotype and TREM-1 expression*. Eur J Immunol, 2013. **43**(4): p. 949-66.
67. Gibot, S., et al., *Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock*. Infect Immun, 2006. **74**(5): p. 2823-30.
68. Haselmayer, P., et al., *TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation*. Blood, 2007. **110**(3): p. 1029-35.
69. Bouchon, A., et al., *A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1111-22.
70. Turnbull, I.R., et al., *Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3520-4.
71. Paloneva, J., et al., *DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 669-75.
72. Hamerman, J.A., et al., *Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2051-5.
73. Kialainen, A., et al., *Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS*. Neurobiol Dis, 2005. **18**(2): p. 314-22.
74. Daws, M.R., et al., *Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 594-9.
75. Piccio, L., et al., *Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis*. Eur J Immunol, 2007. **37**(5): p. 1290-301.
76. Barrow, A.D., et al., *Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 5838-42.
77. Washington, A.V., et al., *TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1489-501.
78. Washington, A.V., et al., *A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1042-7.
79. Lu, Y.T., et al., *Preparation and characterization of monoclonal antibody against protein TREM-like transcript-1 (TLT-1)*. Hybridoma (Larchmt), 2006. **25**(1): p. 20-6.
80. Morales, J., et al., *Soluble TLT-1 modulates platelet-endothelial cell interactions and actin polymerization*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2010. **21**(3): p. 229-36.
81. Derive, M., et al., *Soluble TREM-like transcript-1 regulates leukocyte activation and controls microbial sepsis*. J Immunol, 2012. **188**(11): p. 5585-92.
82. Giomarelli, B., et al., *Inhibition of thrombin-induced platelet aggregation using human single-chain Fv antibodies specific for TREM-like transcript-1*. Thromb Haemost, 2007. **97**(6): p. 955-63.
83. Ramos, G., et al., *The addition of a pregnenolone pendant group enhances the anticancer properties of titanocene dichloride in a mcf-7 xenograft model*. Anticancer Res, 2014. **34**(4): p. 1609-15.

84. Hashiguchi, M., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10495-500.
85. Hemmi, H., et al., *Trem14, an Ig superfamily member, mediates presentation of several antigens to T cells in vivo, including protective immunity to HER2 protein*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1147-55.
86. Ramirez-Ortiz, Z.G., et al., *The receptor TREML4 amplifies TLR7-mediated signaling during antiviral responses and autoimmunity*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 495-504.
87. Kogut, M.H., et al., *Effects of avian triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM-A1) activation on heterophil functional activities*. Dev Comp Immunol, 2012. **36**(1): p. 157-65.
88. Yang, Z., et al., *Crystal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution*. Biochemistry, 2001. **40**(42): p. 12515-23.
89. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
90. Duerschmied, D., C. Bode, and I. Ahrens, *Immune functions of platelets*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 678-91.
91. Scott, T. and M.D. Owens, *Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF-kappaB pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2*. Mol Immunol, 2008. **45**(4): p. 1001-8.
92. Schat, K.A., et al., *Role of position 627 of PB2 and the multibasic cleavage site of the hemagglutinin in the virulence of H5N1 avian influenza virus in chickens and ducks*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30960.
93. St Paul, M., et al., *Characterization of chicken thrombocyte responses to Toll-like receptor ligands*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43381.

9 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Birgit Viertböck für die vertrauensvolle Überlassung des Dissertationsthemas und ihre professionelle und warmherzige Betreuung. Ihre hervorragende fachliche Unterstützung sowie ihre fortwährende Motivation und ihr stetiger Optimismus trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. Göbel danke ich ganz herzlich für den am Institut bereit gestellten Arbeitsplatz und seine sachkundige Unterstützung. Seine fachliche Kompetenz und seine äußerst konstruktiven Ratschläge waren von unschätzbarem Wert.

Danken möchte ich zudem Frau PD Dr. Sonja Härtle und Herrn Prof. Dr. Kaspers für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen. Ihre kritischen Beiträge und ihr kompetenter Rat waren eine große Bereicherung.

Ein herzliches Dankeschön allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Deeg und Kaspers für die kollegiale und gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Marina Kohn, Beatrice Schaerer, Ingrid Riehl und Bärbel Amann für ihre freundliche und stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Felix Habermann danke ich für sein großes Engagement sowie seine sachkundige und erfahrene Unterstützung am Konfokalmikroskop.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Sarah Lettmann für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und ihre professionelle Einführung in die Immunhistochemie.

Für die gute Zusammenarbeit im Tierstall und für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Fritz Meggendorfer, Andreas Schöffmann, Daniela Hölle und Thomas Hoschka.

Ein großer Dank gebührt meiner Arbeitsgruppe für die herzliche Aufnahme in ihr Team und die außergewöhnlich gute Zusammenarbeit im Labor, welche für ein hervorragendes Arbeitsklima mit vielen heiteren Momenten

sorgte. Ich bedanke mich im Besonderen für die ausgezeichnete Einarbeitung, die stete kollegiale Hilfsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang sowie für den seelischen Beistand und den aufmunternden Zuspruch in schwierigen Situationen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Marie-Luise Neulen, Bea Sperling, Isabelle Walliser und Daniela Huhle für ihre Freundschaft und die schöne gemeinsame Zeit bedanken. Sie hatten für jegliche Probleme stets ein offenes Ohr und waren nicht nur im Laboralltag eine große Bereicherung.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Maria Zechmann und Dr. Christian Straub für die freundliche und geduldige Einarbeitung sowie für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei methodischen Problemen.

Bei Catrin Emmerling und Claudia Ruf bedanke ich mich für die zahlreichen entspannten und fröhlichen Abende zu Hause. Ihre Freundschaft, Hilfe, Ratschläge und Heiterkeit waren in den letzten Jahren sehr wertvoll.

Allen meinen lieben Freunden danke ich für ihre Loyalität, ihre Anteilnahme und ihren Zuspruch über all die Jahre. Insbesondere Alona Hartstock, Mia Wagner, Lisa Schaefer und Juliane Jost danke ich von Herzen für die vielen wunderschönen, gemeinsamen Stunden und Gespräche. Mit Ausdauer, Ruhe und Geduld standen sie mir stets zur Seite und haben mich immer wieder aufgemuntert.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir während meines Studiums und der Promotion immer unterstützend, großzügig und geduldig zur Seite standen. Ein ganz besonderes Dankeschön dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für meine Probleme haben, immer das Beste für mich wollen und bereit sind alles dafür zu geben.

Ich bin sehr glücklich eine so wundervolle Familie und so großartige Freunde zu haben!