

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

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

**Das Hühner CLEC-2 Homolog:
Ein Thrombozytenrezeptor mit aktivierender Funktion**

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

von
Marie-Luise Neulen
aus
Kleve

München 2012

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Göbel
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Korbelt Univ.Prof. Dr. Dr. Erhard Priv.-Doz. Dr. Deeg Priv.-Doz. Dr. Eisinger

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literatur	3
2.1 NK Zell Rezeptoren	3
2.2 Signalgebung von NK Zell Rezeptoren	4
2.3 C-typ Lektin ähnliche Proteine des NKC	5
2.3.1 Ly49 Familie	7
2.3.2 NKG2 Familie und CD94	7
2.3.3 NKG2D	8
2.3.4 CLEC-2	8
Signalkaskade CLEC-2	9
Funktionen von CLEC-2	11
2.4 C-typ Lektin ähnliche Proteine und NKC beim Huhn	11
3 Publikation	13
4 Diskussion	22
5 Zusammenfassung	25
6 Summary	26
7 Literaturverzeichnis	27

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
CD	Cluster Nomenklatur (engl. Cluster of differentiation)
CHIR	Hühner Ig-ähnlicher Rezeptor (engl. Chicken Ig-like Receptor)
CRD	Kohlenhydrat erkennende Domäne (engl. Carbohydrate recognition Domain)
CTLD	C-typ Lektin ähnliche Domäne (engl. C-type Lektin like Domain)
FcεRγ	Fcε Rezeptor γ
GPVI	Glykoprotein VI
hemITAM	hemi Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus-1
IEL	intestinale epitheliale Lymphozyten
IFNγ	Interferon γ
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-basierendes hemmendes Motiv
LRC	Leukozyten Rezeptor Komplex (engl. Leucocyte Receptor Complex)
LSCC RP9	Rous Sarkoma veränderte Lymphomzelllinie
MIC-A/B	MHC Klasse I Polypeptid ähnliche Sequenz A/B (MHC class I chain-related gene A/B)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
NKC	natürlicher Kinner Gen Komplex (engl. Natural Killer Gene Complex)
SH2	Src Homologe 2
SHP	SH2 beinhaltende Proteintyrosinphosphatase
Src	Tyrosinkinase Src
Syk	Milz Tyrosin Kinase (engl. Spleen tyrosin kinase)

1 Einleitung

Natürliche Killerzellen (NK) repräsentieren eine Subpopulation von Lymphozyten, die aufgrund ihrer 1975 bei der Maus entdeckten Eigenschaft, eine Maus Leukämie Zelllinie töten zu können, ihren Namen fanden [1-2]. NK Zellen entwickeln sich aus Vorläuferzellen des Knochenmarks, morphologisch handelt es sich um große, granuläre Lymphozyten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen insbesondere Viren, Bakterien und intrazellulären Parasiten sowie entarteten Körperzellen [3]. Zusätzlich zu den zytotoxischen Eigenschaften sind NK Zellen auch sehr potente Produzenten von Zytokinen wie beispielsweise IFN γ [4]. NK Zellen werden als eine sehr ursprüngliche Form von Zellen des Immunsystems angesehen. Die NK Zell Eigenschaft Zytotoxizität ist bereits bei Wirbellosen wie Seescheiden, Manteltieren oder Regenwürmern nachweisbar [5-7]. Solchen Lebewesen fehlen die sehr spezialisierten Zellen des erworbenen Immunsystems wie T-Zellen und B-Zellen. Dennoch teilen NK Zellen mit T-Zellen einige charakteristische Merkmale und werden aus diesem Grund von Evolutionsbiologen als eine Art Vorläuferzelle für zytotoxische T-Zellen betrachtet [8-9]. NK Zellen wurden beim Säuger sehr intensiv erforscht, was eine Vielzahl von Veröffentlichungen auf diesem Gebiet insbesondere bei Mensch und Maus belegt. So konnten eine Reihe wichtiger Erkenntnisse über die Funktion der NK Zellen beim Infektionsgeschehen einiger Erkrankungen sowie der Kommunikation mit anderen Immunzellen, abgeleitet werden [10-11]. Für das Huhn liegen kaum Informationen zu NK Zellen vor, obwohl man schon frühzeitig NK Zell Aktivität beim Huhn nachweisen konnte [12-13]. Insbesondere für intestinale epitheliale Lymphozyten konnte eine zytotoxische Aktivität gegen eine mit Rous Sarkoma veränderte Lymphomzelllinie (LSCC RP9) sowie bei Infektion mit Eimerien gezeigt werden [14-15]. Der Mangel an Erkenntnissen ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass kaum NK Zell spezifische monoklonale Antikörper vorhanden sind, welche die einzelnen Zellen identifizieren helfen könnte und so für die Kultivierung oder Infektionsstudien nutzbar machen würde. Um Krankheitsabläufe zahlreicher Infektionskrankheiten beim Huhn besser

verstehen und weitere Hinweise zur Evolution des Immunsystems ableiten zu können, wäre es interessant, näheres über NK Zellen beim Huhn verstehen zu lernen. Mit dem Hühner Genom Projekt [16-17] wurden detaillierte Informationen zum Erbgut des Huhnes zugänglich, was für die genaue Studie und Charakterisierung von einzelnen Genen vom großem Nutzen ist. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, anhand eines genombasierten Ansatzes einen Marker für NK Zellen beim Huhn zu erzeugen, welcher eine phänotypische und funktionelle Beschreibung dieser Zellen ermöglichen würde. Das CD94 Molekül erschien als geeigneter Kandidat, da es bereits bei Wirbellosen einen NK Zellmarker darstellt [6] und zudem Hinweise auf das Vorhandensein eines ähnlichen Moleküls beim Huhn deuteten [18].

2 Literatur

2.1 NK Zell Rezeptoren

NK Zellen tragen mit Ihrer Eigenschaft infizierte Zellen direkt töten zu können, sowie der rasanten Produktion von Zytokinen und Chemokinen, entscheidend zur Immunantwort des Wirtes bei. Obwohl NK Zellen eigentlich dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, existieren für Maus und Mensch Hinweise, dass NK Zellen Attribute mit Zellen des erworbenen Immunsystems wie B- und T-Zellen teilen. Hierzu zählen beispielsweise die klonale Expansion während einer Infektion oder das Vorhandensein von langlebigen Gedächtnis NK Zellen [19-21]. Im Gegensatz zu B- und T-Zellen, ist zur Gewährleistung der NK Zell Funktion und Differenzierung kein Gen Rearrangement erforderlich, vielmehr wird die Flexibilität der NK Zellantwort über eine Vielzahl von auf der Zelloberfläche exprimierten, inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren gewährleistet [22-23]. Ein großer Anteil dieser Rezeptoren interagiert mit klassischen und nicht klassischen MHC Klasse I Molekülen, die auf gesunden Zellen exprimiert und häufig in Folge zellulärer Transformation oder Virusinfektion herunter- oder hochreguliert werden. Die Beobachtung dieser Interaktion führte zur Formulierung der „Missing Self Hypothese“ sowie der „Induced Self“ Hypothese [24-26]. Ersteres Modell basiert auf der Annahme, dass NK Zellen bevorzugt Zellen erkennen und abtöten, welche MHC Klasse I Moleküle auf der Oberfläche herunterreguliert haben und umgekehrt in ihrer Funktion gehemmt werden, wenn MHC Klasse I Moleküle auf der Oberfläche exprimiert werden. Das „Induced Self“ Modell beschreibt die Erkennung zellulärer Stressliganden durch NK Zellrezeptoren, die infolge von maligner Transformation oder viraler Invasion induziert werden. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass NK Zell-Aktivierung mehr über die Balance zwischen aktivierenden und hemmenden Signalen reguliert wird, indem MHC Klasse I abhängige inhibitorische Signale über aktivierende Signale dominieren [25] oder das Fehlen von MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von Zellen nicht in jedem Fall NK Zellen aktiviert. Obwohl beispielsweise rote Blutkörperchen kein MHC I exprimieren, werden diese von NK Zellen nicht attackiert, so dass der Schluß nahe liegt, dass

Erythrozyten Liganden fehlen, welche aktivierende Rezeptoren von NK Zellen binden [27].

2.2 Signalgebung von NK Zell Rezeptoren

Aktivierende und hemmende Funktion vermittelnde Rezeptoren zeigen starke Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne. Die für die Funktion entscheidenden Bereiche befinden sich in den Domänen der Transmembran und der zytoplasmatischen Region. Hier unterscheiden sich die Rezeptoren in Bezug auf die Abfolge bestimmter Aminosäuren, die Länge der Aminosäuresequenz oder die Ladung [28].

Hemmende NK Zell Rezeptoren

Die Signalgebung der inhibitorischen Rezeptoren wird über einen Immunrezeptor Tyrosin basierendes hemmendes Motiv (ITIM) in der zytoplasmatischen Domäne vermittelt [29]. Dieses ist definiert durch die Sequenz von sechs Aminosäuren in der Kombination Isoleucin/ Leucin/ Valin oder Serin, einer beliebigen Aminosäure, Tyrosin, wiederum zwei beliebige Aminosäuren gefolgt von Leucin oder Valin (I/L/V/S)xYxx(L/V). Nach der Bindung des Liganden werden die Tyrosinreste im ITIM über eine Tyrosin Kinase der SRC-Familie phosphoryliert, so dass die SH2 Domäne enthaltende Protein Tyrosin Phosphatase 1 (SHP1) oder andere Phosphatasen wie SHP2 oder die SH2-Domäne enthaltende Inositol-Polyphosphatase 5' Phosphatase (SHIP1) binden kann [30-31]. Diese Phosphatasen bewirken dann eine Unterbrechung der durch aktivierenden Signalgebung vermittelten Kaskade, wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist [32].

Aktivierende NK Zell Rezeptoren

Aktivierende Rezeptoren besitzen einen kurzen zytoplasmatischen Bereich und eine positiv geladene Aminosäure wie Arginin oder Lysin in der Transmembran Domäne. Über die positive Ladung kommt es zu einer nicht kovalenten Bindung an eine negativ geladene Aminosäure wie Asparaginsäure eines Adaptormoleküls. NK Zellen exprimieren zumeist Adaptormoleküle wie das DNAX aktivierende Protein DAP12 [33], die FcεRγ Kette [34] oder CD3ζ, die ein Immunrezeptor Tyrosin basierendes aktivierendes Motiv (ITAM) im zytoplasmatischen Teil besitzen [35]. Ein ITAM

besteht aus zwei YxxL/I Motiven (Tyrosin, zwei beliebigen AS, Leucin oder Isoleucin) welche durch eine Abfolge von sechs bis acht beliebigen Aminosäuren getrennt sind (YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I) [36]. Wird der assoziierte Rezeptor stimuliert, kommt es zur Phosphorylierung von Tyrosinresten an den ITAM Motiven, diese Reaktion wird durch Tyrosinkinase wie Src Kinasen oder Syk Tyrosin Kinasen bewirkt. Die nun folgende Signalkaskade führt zur Aktivierung der Zelle, bei NK Zellen in Form von Zytotoxizität der Zytokin Produktion.

Die meisten der aktivierenden und hemmenden NK Zell-Rezeptoren werden von Genen in zwei Genomregionen codiert, dem Leukozyten Rezeptor Komplex (LRC) und dem natürlichen Killer Gen Komplex (NKC). Der LRC codiert für Moleküle der Immunglobulin Superfamilie (IgSF). Dieser ist beim Menschen auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert und bei der Maus auf Chromosom 7 [37-38]. Der NKC codiert für eine große Anzahl von C-Typ Lektin ähnlichen Rezeptoren, welche auf NK Zellen und anderen Zellen des Immunsystems exprimiert werden [38]. Die auf dem NKC codierten Gene zeigen eine starke Ähnlichkeit der genetischen Struktur, sie werden daher in verschiedenen Clustern zusammengefasst, die ähnliche Gene einschließen. Beim Menschen finden sich die Gene des NKC auf Chromosom 12p13.1 [39] und bei der Maus auf Chromosom 6 [40-41].

2.3 C-typ Lektin ähnliche Proteine des NKC

C-typ Lektine zählen zu dem am frühesten identifizierten Lektinen, darunter beispielsweise das bovine Konglutinin. Die Bezeichnung „Lektin“ definiert Proteine oder Glykoproteine welche Kohlenhydratstrukturen erkennen und binden. Für die C-typ ähnlichen Lektine ist dieser Begriff etwas irreführend gewählt, da nicht alle der zu dieser Gruppe zählenden Moleküle Kohlenhydrate erkennen, sondern auch Lipidmoleküle und anorganische Liganden binden. Ursprünglich wurde der Begriff gewählt, um eine Gruppe von Ca²⁺ abhängigen (=C-typ) Kohlenhydrat bindenden Proteinen von anderen Ca²⁺ unabhängigen Lektinen zu unterscheiden. Die Kohlenhydratbindende Eigenschaft wird über einen als CRD (carbohydrate-recognition-domain) bezeichneten Bereich vermittelt, welcher in allen Ca²⁺

abhängigen Lektinen nachweisbar ist, nicht aber in anderen Lektinen (Ca^{2+} unabhängigen). In der CRD Region ist ein Motiv sehr konserviert und für die Ca^{2+} Bindung verantwortlich. Interessanterweise erfolgt aber nicht bei allen CRD Motiven eine Kalziumbindung oder eine Bindung an Kohlenhydrate. Mit der Bezeichnung „C-typ Lektin-ähnlich“ sollten sich diese etwas widersprüchlichen Eigenschaften der Moleküle vereint finden.

C-typ Lektin ähnliche Proteine weisen eine sehr ungewöhnliche Faltung auf. Die CTLD ist als Doppel-Schleife gefaltet, eine große Schleife ist durch N- und C-terminale β Stränge ($\beta 1$ und $\beta 5$), die ein antiparalleles β -Faltblatt bilden, geformt. Die zweite Schleife befindet sich innerhalb dieser Struktur und wird auch als lange Schleife bezeichnet. Zur Schleifenbildung tragen vier Cysteine, welche die am meisten konservierten Strukturen der CTLD Teile darstellen, zur Bildung von Disulfidbrücken bei. Die lange Schleife ist zudem für die Ca^{2+} Bindung verantwortlich. Sie fehlt bei sogenannten kompakten CTLD. Zusätzlich zu den Cysteinen ist noch ein weiteres Sequenzmerkmal sehr charakteristisch, das sogenannte WIGL Motiv, welches im $\beta 2$ Strang lokalisiert und ebenfalls hoch konserviert ist.

Anhand der Sequenz der C-typ Lektin ähnlichen Proteine sowie ähnlicher Funktionsmerkmale lassen sich 17 Gruppen unterscheiden. Die beim Menschen auf dem NKC lokalisierten C-typ Lektine zählen zu den Gruppen II und V der 17 C-typ Lektin Gruppen [32]. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine CTLD aufweisen, nicht Ca^{2+} abhängig sind und als Typ II Transmembranproteine exprimiert auf der Zelloberfläche vorkommen. Bei Typ II Transmembranproteinen ragt der N-Terminus des Proteins ins Zellinnere und der C-Terminus zeigt extrazellulär und hat damit umgekehrte Orientierung wie die meisten Rezeptoren. Von beiden Gruppen sind nur innerhalb der Gruppe V NK Zell Rezeptoren zu finden. Die Überzahl dieser Proteine kommt als Dimer auf der Zelloberfläche vor, wenige Mitglieder der Gruppe V entfalten ihre Funktion als Monomer wie beispielsweise LOX-1 und DECTIN1 [42]. Rezeptoren die auf NK Zellen exprimiert werden sind beispielsweise Ly49, CD94, NKG2 oder Nkrp1 bei der Ratte. Zu Rezeptoren die auf anderen Zellen exprimiert werden, zählen DECTIN1, LOX1, CLEC-1 und CLEC-2 [32, 43].

2.3.1 Ly49 Familie

Ly49 ist beim Menschen als ein einzelner Locus vorhanden, bei der Maus handelt es sich jedoch um eine polymorphe Genfamilie, die 16 Gene und Pseudogene (Ly49a-q) enthält, welche eine Vielzahl von Funktionen und Expressionsmustern aufweisen [44]. Eine Kartierung der Gene konnte zeigen, dass diese Gene 620-kb telomerisch zu CD69 geklustert sind [45]. Als Ligand fungieren bei der Maus MHC Klasse I Moleküle, der größte Teil der Liganden ist aber noch nicht bekannt. Einige Mitglieder darunter Ly49a, Ly49c, Ly49g und Ly49i enthalten ITIMs und fungieren als hemmende NK Zell Rezeptoren, sobald Sie MHC Klasse I Moleküle erkennen. Wenigen Mitgliedern fehlt das ITIM Motiv, diese besitzen eine positiv geladene Transmembrandomäne [32]. Bei der Maus bindet Ly49h direkt an ein virales Glykoprotein m157. Dieses wird von Zellen exprimiert, welche mit Maus Zytomegalievirus infiziert sind [46-47].

2.3.2 NKG2 Familie und CD94

Vergleichbar zur Ly49 Familie sind in der NKG2 Familie Mitglieder mit aktivierender und solche mit hemmender Funktion zu finden. Rezeptoren dieser Familie wurden zuerst im menschlichen Genom identifiziert [48]. NKG2 wird als Heterodimer mit CD94 auf der Zelloberfläche exprimiert, was für die Ausbildung der Signalfunktion entscheidend ist [49]. CD94 hat eine kurze zytoplasmatische Domäne, welcher Motive für die Signalgebung fehlen. Die Signalfunktion wird entweder über ITIM Motive vermittelt (hemmend) oder über Assoziierung von geladenen Aminosäuren im Transmembranteil des Heterodimers (aktivierend). NKG2A-CD94 des Menschen und NKG2C-CD94 erkennen das nicht klassische MHC Klasse I Molekül HLA-E [50]. Bei der Maus erkennen diese Heterodimere und zusätzlich NKG2E-CD94 das HLA-ähnliche Qa-1 [51]. Für CD94 wurde kürzlich entdeckt, dass es beim B6 Mausstamm für die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Mauspocken verantwortlich ist [52].

2.3.3 NKG2D

NKG2D besitzt nur annähernd Ähnlichkeit mit den anderen Mitgliedern der NKG2 Familie. Es formt keine Heterodimere mit CD94 sondern wird als Homodimer auf der Zelloberfläche von $\gamma\delta$ T Zellen und NK Zellen beim Menschen [53] exprimiert [54]. Für die Signalgebung ist die Assoziation mit DAP10 Molekülen erforderlich, durch die zytotoxische Funktionen und in einigen Fällen auch Zytokinsekretion ausgelöst werden [53, 55-56]. Die Seitenketten der Bindungsdomäne von NKG2D weisen eine hohe Flexibilität auf, so dass NKG2D Moleküle eine Reihe unterschiedlicher Liganden binden können [57]. NKG2D Liganden schließen MHC Klasse I verwandte Proteine ein, dessen Expression durch Schädigung der DNA oder infolge einer eingeleiteten Hitzeschockantwort ausgelöst wird [58-59]. Die Liganden können auch bei gesundem Gewebe nachgewiesen werden, dabei wird ein gewisser Schwellenwert unter physiologischen Bedingungen nicht überschritten, denn die Expression der Liganden von NKG2D ist eng reguliert [60]. Beim Menschen sind MIC-A, MIC-B und ULBP1-4 als Liganden beschrieben [53, 61]. Bei der Maus konnten keine MIC Homologe auf dem synthetischen Abschnitt gefunden werden [62]. Stattdessen wurden zwei Proteinfamilien als Liganden identifiziert, das frühe Retinsäure Protein-1 [63] und H60 [64], ein Minor Histocompatibility Antigen.

MIC-A und MIC-B sind normalerweise beschränkt auf Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes [59], sie können unregelmäßig auf Karzinomen von Lunge, Niere, Ovar, Prostata und Colon vorkommen [65]. Die Expression von MIC-A und MIC-B kann bei zellulärem Stress induziert werden [65], wie beispielsweise bei einer Infektion mit Mycobakterium Tuberkulosis [66], Escherichia coli [67] oder bei einer Virusinfektion [68]. Für die Induktion dieser Stressliganden ist ein Hitzeschock Promotor Element entscheidend [59].

2.3.4 CLEC-2

CLEC-2 gehört zur Gruppe V der C-typ Lektin ähnlichen Rezeptoren. Es zählt zu den nicht klassischen C-typ Lektinen, da es eine CTLD hat, die Ähnlichkeit zu einer Kohlenhydrat erkennenden Domäne aufweist, jedoch ohne

Consensus Sequenz zur Erkennung von Zuckern und Kalzium [69]. CLEC-2 weist beim Menschen zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen an Position 120 und 134 auf. In nicht glykosylierter Form hat es eine Molekülgröße von etwa 27 kDa. CLEC-2 wird beim Menschen auf Blutplättchen [70], Monocyten, Dendritischen Zellen, NK Zellen, Granulocyten [69], Megakaryozyten [71], Endothelzellen der Lebersinusoiden und Kupffer Zellen [72], bei der Maus auch auf Neutrophilen [73] und Makrophagen [74] exprimiert. Als Ligand wurde zunächst Rhodocytin identifiziert, ein aus der Malaischen Mokassinotter (*Calloselasma rhodostoma*) isoliertes Schlangengift [70]. Weiterer exogener Ligand ist HIV-1 [71]. Als endogener Ligand wurde Podoplanin nachgewiesen [75]. Podoplanin ist ein Typ I Transmembran Sialomucin-ähnliches Glykoprotein. Es wird von einer Reihe Zellen exprimiert, darunter Nierenpodocyten, Typ I Alveolarzellen der Lunge, Endothelzellen lymphatischer Gefäße und einigen Tumorzellen [76], nicht aber von Endothelzellen der Blutgefäße und Thrombocyten [77].

Für die Bindung zwischen Podoplanin und CLEC-2 ist die Sialinsäure des O-Glykans von Podoplanin verantwortlich [78]. Die Glykosylierungsstellen des CLEC-2 Moleküls sind jedoch nicht für die Bindung zum Liganden entscheidend [79].

Signalkaskade CLEC-2

Durch Bindung an einen Liganden wie Podoplanin wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche die Thrombozyten aktiviert und Plättchenaggregation bewirkt. Als entscheidend für die Weiterleitung des Signals konnte ein Motiv in der Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen Teils mit der Sequenz YxxL (Tyrosin gefolgt von zwei beliebigen Aminosäuren gefolgt von Leucin) ausgemacht werden. Dieses Motiv ist dem ITAM Motiv (YxxL/Ix₆₋₈YxxL/I), welches zwei YxxL Motive besitzt, sehr ähnlich. Das CLEC-2 Motiv weist im Gegensatz dazu nur ein YxxL auf und wird daher als hem-immunorezeptor Tyrosin basiertes aktivierendes Motiv (hemITAM) bezeichnet [70]. Unter den Rezeptoren, welche Plättchenaggregation vermitteln, sind einige der Immunglobulin Superfamilie, welche ITAM Motive besitzen, darunter beispielsweise der Kollagenrezeptor GPVI. Bei Kreuzvernetzung wird der

GPVI Rezeptor aktiviert, so dass Tyrosine im ITAM Teil von den Src Kinasen Fyn und Lyn phosphoryliert werden. Letztere sind konstitutiv mit GPVI assoziiert. Hierdurch kann dann die Tandem SH2 Domäne von Syk gebunden werden, so dass Syk aktiviert wird. Dadurch wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung der Zelle führt. Der Signalpfad von CLEC-2 ist dem des GPVI sehr ähnlich, ab der Aktivierung von Syk Kinasen sogar nahezu identisch [70, 80]. Der Unterschied besteht darin, dass das hemITAM hauptsächlich durch Syk phosphoryliert wird und nicht durch Src Kinasen [81-82]. Bei der Maus wird CLEC-2 sogar unabhängig von Src Kinasen nur über Syk phosphoryliert [83].

Dies ist insofern erstaunlich, als Syk eine Tandem SH2 Domäne aufweist, CLEC-2 aber nur ein hemITAM Motiv mit einem Tyrosin zur Phosphorylierung besitzt. CLEC-2 kommt auf der Zelloberfläche von Thrombozyten als nicht kovalent verknüpftes Homodimer vor [84] und die Arbeitsgruppen um Watson und O' Callaghan konnten zeigen, dass die Tandem SH2 Domäne von Syk an die phosphorylierten YxxL Motive von zwei CLEC-2 Molekülen mit einer Stöchiometrie von 2:1 binden [85]. Zudem sind weitere Rezeptoren bekannt, die ein hemITAM Motiv besitzen und durch Syk Kinasen aktiviert werden. Darunter sind zwei weitere C-typ Lektin ähnliche Proteine, die ebenfalls auf dem NKC lokalisiert sind, DECTIN1 und CLEC9A sowie ein Mitglied der IgSF NKp80 [86-87]. DECTIN1 kann auf Dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden. Infolge von Aktivierung durch β -Glukane kommt es durch Syk Aktivierung über YxxL zur Produktion von IL-2 [88].

CLEC9A wird hauptsächlich von BDCA3+ Dendritischen Zellen exprimiert, ein endogener Ligand wurde bisher nicht gefunden [89]. Diese Rezeptoren weisen neben dem hemITAM Motiv noch eine weitere Gemeinsamkeit in der Aminosäuresequenz auf. Dem hemITAM Motiv gehen jeweils eine Reihe negativ geladener Aminosäuren wie Glutaminsäure (E) und Asparaginsäure (D) voraus. Die Sequenz von (D (oder E) ExxYxxL könnte möglicherweise eine Schlüsselsequenz für die Erkennung und Aktivierung über Syk sein [82]. Hierfür spricht auch, dass ein anderes Molekül, das DC-SIGN, welches

ebenfalls ein YxxL Motiv besitzt jedoch eine anderes Aminosäuremuster vor diesem Motiv tragend, nicht durch Syk aktiviert wird [90].

Funktionen von CLEC-2

Die Interaktion zwischen CLEC-2 und Podoplanin hat neben der Aktivierung von Thrombozyten/ Blutplättchen noch weitere Funktionen. Unter anderem spielt es beim pathophysiologischen Geschehen mancher Tumore und bei der Gefäßentwicklung eine Rolle.

Podoplanin wird auch von Tumorzellen exprimiert, darunter sind Plattenepithelkarzinome [91], Seminome [91] und Gehirntumore [92] beschrieben, was eine Plättchenaggregation über CLEC-2 auslösen kann. Die Plättchen adhären dann an den Tumor und isolieren diesen von möglichen Attacken von NK Zellen, schütten Wachstumsfaktoren oder solche für die Angiogenese des Tumors dienlichen Botenstoffe aus. Zudem scheint es bei der Metastasierung des Tumors förderlich zu sein [76, 93].

Die Podoplanin Expression ist in Geweben arteriosklerotischer Läsionen stark erhöht, was auf eine Bedeutung von Podoplanin bei der Entstehung von Thrombose deutet. Podoplanin ist daher als molekularer Angriffspunkt für die Herstellung neuer Antithrombosemedikamente denkbar [94]. Versuche mit CLEC-2 Knockout Mäusen haben gezeigt, dass CLEC-2 bei der Lymphangiogenese beteiligt ist, wo es für die Separation von Lymph- und Blutgefäßendothel entscheidende Bedeutung hat [95].

2.4 C-typ Lektin ähnliche Proteine und NKC beim Huhn

Beim Huhn ist eine zum NKC des Menschen syntenische Region beschrieben [96]. Diese Region weist aber lediglich zwei C-typ Lektin ähnliche Gene auf, welche beim Huhn auf Chromosom 1 lokalisiert wurden [18]. Dies sind ein Gen, welches mit dem Säuger CD69 vergleichbar ist und ein anderes, das als Homolog zu CD94 und NKG2 beschrieben worden ist. Zuvor war für Knochenfische ein aus CD94 und NKG2 zusammengesetztes Hybridgen postuliert worden [97]. Das Hühner CD94/NKG2 Gen wurde auf mRNA Ebene in Weißen Blutkörperchen und in Lungengewebe nachgewiesen. CD69,

ebenfalls ein Gruppe V C-typ Lektin ähnliches Protein, weist keine Signalmotive in der Aminosäuresequenz auf. Zudem wurde CD69 spezifische mRNA in einer großen Anzahl von Geweben nachgewiesen, so dass es unwahrscheinlich ist, dass dieser Rezeptor beim Huhn ein NK Zellrezeptor darstellen könnte [98].

Zwei weitere C-typ Lektin ähnliche Rezeptoren, B-NK und B-lec sind beim Huhn in der MHC Region auf dem Chromosom 16 organisiert [99-101]. Auf dem Chromosom 17.5 ist ein weiteres C-typ Lektin in der MHC Rfp-Y Region codiert. Dieses weist Sequenzähnlichkeit mit dem Rezeptor NKRP1 beim Säuger auf, besitzt aber keine Merkmale von aktivierenden oder hemmenden NK Zellrezeptoren. Y-Lec1 und Y-Lec2 repräsentieren zwei weitere Gruppe V C-typ Lektin ähnliche Rezeptoren, die in der Rfp-Y Region lokalisiert sind und denen Signalmotive im zytoplasmatischen Teil fehlen [98].

3 Publikation

Immunogenetics
DOI 10.1007/s00251-011-0591-z

ORIGINAL PAPER

Identification of a chicken CLEC-2 homologue, an activating C-type lectin expressed by thrombocytes

Marie-Luise Neulen & Thomas W. Göbel

Received: 12 September 2011 / Accepted: 17 November 2011
Springer-Verlag 2011

Abstract Receptors on natural killer (NK) cells are classified as C-type lectins or as Ig-like molecules, and many of them are encoded by two genomic clusters designated natural killer gene complex (NKC) and leukocyte receptor complex, respectively. Here, we describe the analysis of an NKC-encoded chicken C-type lectin, previously annotated as homologue to CD94 and NKG2 and thus designated chicken CD94/NKG2. To further elucidate its potential function on NK cells, we produced a specific mab by immunizing with stably transfected HEK293 cells expressing this lectin. Staining of various chicken tissues revealed minimal reactivity with bursal, or thymus cells. In peripheral blood mononuclear cell and spleen, however, the mab reacted with virtually all thrombocytes, whereas most NK cells in organs such as embryonic spleen, lung and intestine were found to be negative. These findings indicate that the gene may not resemble CD94/NKG2, but rather a CLEC-2 homologue, a claim further supported by sequence features such as an additional extracellular cysteine residue and the presence of a cytoplasmic motif known as a hem immunoreceptor tyrosine-based activation motif, found in C-type lectins such as Dectin-1, CLEC-2, but not CD94/NKG2. The biochemical analyses demonstrated that CLEC-2 is present on the cell surface as heavily glycosylated homodimer, which upon mab crosslinking induced thrombocyte activation, as measured by CD107 expression. These analyses reveal that the chicken NKC may not encode NK cell receptor genes, in particular not CD94 or NKG2 genes, and identifies a chicken CLEC-2 homologue.

Keywords Chicken · NK cell · Thrombocyte · CLEC-2

M.-L. Neulen · T. W. Göbel (*)
Institute for Animal Physiology,
Department of Veterinary Sciences, University of Munich,
Veterinärstr. 13,
80539 Munich, Germany
e-mail: goebel@lmu.de

Abbreviations

CHIR Chicken Ig-like receptor genes
hemITAM hem immunoreceptor tyrosine-based
activation motif
LRC Leukocyte receptor cluster
NKC Natural killer gene complex

Introduction

Mammalian natural killer (NK) cells and their receptors have been the focus of intensive research during the past years (Lanier 2008; Vivier et al. 2011). As cells of the innate immune system, NK cells are thought to have evolved prior to the adaptive immune system; however, information regarding NK cells or NK cell activity and their receptors is scarce in lower vertebrates (Yoder and Litman 2011). In contrast to cytotoxic T cells, NK cells use multiple receptors to recognize their targets (Parham 2008). Major histocompatibility complex (MHC) class I molecules are key regulators of NK cell activity as first described by the “missing self hypothesis” (Ljunggren and Karre 1990). NK cells recognize MHC class I on healthy cells and downregulation of MHC class I as the result of viral infection or carcinogenesis permits the NK cell activation and destruction of target cells. The NK cell receptors that bind to MHC class I are mainly encoded by two distinct genomic areas (Kelley et al. 2005). The leukocyte receptor complex (LRC) on human chromosome 19q13.4 encodes the killer cell immunoglobulin-like receptors alongside other leukocyte Ig-like receptors. Due to the presence or absence of cytoplasmic signalling motifs or a basic transmembrane residue that mediates the association to adaptor molecules, these receptors are further distinguished into inhibitory or activating types (Barrow and Trowsdale 2008).

In contrast to the LRC-encoded receptors that structurally belong to the Ig superfamily, the second group of receptors represents type II transmembrane C-type lectins. They are encoded by the NK cell gene complex (NKC) on human chromosome 12p13. Important members include the Ly49 family and CD94/NKG2 heterodimers (Yokoyama and Plougastel 2003).

In order to gain more insight into chicken NK cells and their receptors, we and others have analysed the two major chromosomal regions containing NK cell receptor genes (Chiang et al. 2007; Lochner et al. 2010). The chicken LRC is vastly expanded with a high number of chicken Ig-like receptor genes (CHIR), some of which are expressed on NK cells (Viertlboeck et al. 2010). Similarly to mammals, the CHIR gene family contains potential activating, inhibitory and bifunctional receptors (Viertlboeck et al. 2005). The chicken LRC also encodes a high affinity Fc receptor for chicken IgY (Viertlboeck et al. 2007, 2009b).

The chicken NKC is located on chromosome 1 and apparently only contains two C-type lectin genes (Chiang et al. 2007). Based on sequence and structural comparisons, these genes were previously identified as a chicken CD69 homologue and a gene that shares sequence features of both CD94 and NKG2, a situation comparable to a teleostean fish CD94/NKG2 hybrid gene (Sato et al. 2003).

In an attempt to generate novel tools that specifically react with chicken NK cells, we produced a mab specific for the CD94/NKG2 homologue. To our surprise, this antigen turned out to be exclusively expressed by thrombocytes which upon mab crosslinking expressed the CD107, a marker for degranulation. These features together with sequence reanalysis in particular of the cytoplasmic domain lead us to the proposal that this C type lectin originally described as chicken CD94/NKG2 hybrid indeed represents a CLEC-2 homologue. These findings provide novel information regarding NK cell receptor phylogeny and point to a putative role of thrombocytes during immune responses.

Methods

DNA cloning, transfection and expression

Since our analyses suggest that the previously assigned chicken CD94/NKG2-like gene resembles a homologue to CLEC-2, we will designate this gene (accession number DQ 156496) as chicken CLEC-2 throughout this report. CLEC-2 was PCR-amplified using as a template cDNA prepared from B19 spleen and the primer pair 5'-AAGATGGAGGATGAGGAAGG-3' and 5'-GGCAAATTGGACAGCTCCT-3' according to standard methods. The PCR product was cloned into pcDNATM 3.1/V5-HisTOPO[®] TA Vector (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). A stable HEK-293 cell line (designated 293-CLEC-2 cells) was

prepared with the construct using polycationic reagent (Metafectene Mix, Biontex, Planegg, Germany) according to the protocol provided. Transfected cells were incubated for 24 h (37°C, 5% CO₂) under standard growth conditions, subsequently seeded in a 96-well flat bottom plate and cultured with medium containing 0.8 mg/ml G418 (Biochrom AG, Berlin, Germany) for 2 weeks. Growing single colonies were monitored by Flow Cytometry (FACS Cantoll, BD, Heidelberg, Germany). 293-CLEC-2 cells were stained with anti-V5 mab (Serotec, Düsseldorf, Germany, mouse IgG2a) followed by a secondary anti-mouse IgG2a-FITC conjugate (SBA, Birmingham, USA, no. 1080-02).

Mab production, cell preparation, flow cytometry

BALB/c mice were repeatedly immunized with the 293-CLEC-2 cells as described before (Viertlboeck et al. 2004), and mab were generated according to standard procedures employing the X63-AG8.653 myeloma cell line. Hybridoma supernatants were screened by flow cytometry on 293-CLEC-2 cells as well as untransfected 293 cells. M11 and LSL chickens were hatched at the Institute of Animal Physiology, University of Munich and used for the experiments at the age of 6–10 weeks. Turkey blood was obtained from a local slaughterhouse. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were extracted from heparinised blood using Ficoll-Paque density centrifugation. Chicken splenocytes, embryonic splenocytes from day 14 embryos, thymocytes and bursal cells were harvested and prepared through a stainless steel mesh to generate a single-cell suspension. Mononuclear cells were obtained from the cell suspensions by density centrifugation on Ficoll-Paque. Lung cells were prepared using collagenase and DNase digestions as described (Jansen et al. 2010). Intestinal epithelial lymphocytes were isolated from the duodenal loop as reported before (Göbel et al. 2001). Monocyte-derived macrophages were obtained after in vitro culture of PBMC-derived monocytes for 3 days in RPMI 1640 supplemented with 8% FCS and 2% chicken serum (Invitrogen) (Peck et al. 1982). For single-cell staining, cells were incubated with 8 G8 mab followed by an anti-mouse IgG2a-FITC conjugate (SBA, no. 1080-02) whereas for double staining, the cells were first incubated with a mixture of primary mabs, followed by a mixture of goat-anti-mouse IgG2a-FITC and depending on the isotype of the second mab either goat-anti-mouse IgG1-PE (SBA, no. 1070-09), goat-anti-mouse IgG2b-PE (SBA, no. 1090-09) or goat-anti-mouse IgG3-PE (SBA no. 1100-09). The mab used were K1 (mouse IgG1) specific for thrombocytes and macrophages (Kaspers et al. 1993), 3-298 (mouse IgG2b) specific for CD8 (Li et al. 1999), 28-4 (mouse IgG3) recognizing an unidentified antigen present on intestinal NK cells (Göbeletal. 2001) and 8 G8 (mouse IgG2a) specific for CLEC-2 as described in this report. For each staining,

Immunogenetics

appropriate controls with isotype-matched control mab were used, but did not show any staining. Cells were analysed by flow cytometry (FACS Canto II, Beckton Dickinson) using the BD FACS DIVA 6.1.3 software.

Immunoprecipitation, western blot

293-CLEC-2 cells (1×10^8) were lysed for 45 min on ice in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris–Cl pH 7.4, 1 mM EDTA) supplemented with 1% Triton X-100 and a protease inhibitor mixture (complete; Roche, Mannheim, Germany). Cell extracts were immunoprecipitated by an anti-V5 mab (Serotec) and protein A agarose (Roche, Mannheim, Germany). The immunoprecipitates were eluted with 1× sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer and separated on 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing and non-reducing conditions. For deglycosylation, precipitated proteins were incubated with PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) at 37°C for 3 h. Control incubations were performed in the absence of enzyme. Proteins were transferred to nitrocellulose by semi-dry blotting. Membranes were blocked with 5% of skim milk in PBS-T and incubated with antiV5-HRP (Invitrogen). Detection was performed with ECL-A solution containing 0.1 M Tris–HCl ad 100 ml aqua dest. pH 8.6 supplemented with 25 mg Luminol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and ECL-B solution comprised of 0.110 g para-hydroxy coumarin acid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) solved in 100 ml DMSO and ECL-C solution H_2O_2 30% (v/v).

CD107 degranulation assay

For analysing activation properties of 8 G8 mab, the CD107 degranulation assay was performed as described before (Jansen et al. 2010). Briefly, PBMC were stimulated simultaneously with 8 G8 mab, crosslinking anti-mouse IgG2a-FITC antibody (SBA) and a mab against chicken CD107 (5 G10, mouse IgG1, kindly provided by Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa) in the presence of GolgiStop™ (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), a protein transport inhibitor containing monensin. Controls were performed identically but in the presence of an irrelevant mab instead of 8 G8. The cells were incubated for 15, 20 and 30 min (37°C, 5% CO_2), stained with anti-IgG1-PE antibody and analysed by flow cytometry.

Results

The 8 G8 mab specifically recognizes CLEC-2

The chicken NKC harbours only two C-type lectin encoding genes (Chiang et al. 2007). Since chicken CD69 has a

widespread mRNA expression pattern, it is unlikely to represent a specific NK cell marker. We therefore focused on the second C type lectin and generated specific mabs. For this purpose, this lectin was stably expressed in HEK 293-T cells. The expression vector contained an in-frame C-terminal V5 tag, and due to the type II transmembrane orientation, this tag was on the extracellular domain accessible for surface staining (Fig. 1a).

Hybridoma supernatants were first screened on 293-CLEC2 cells and positive reacting supernatants successively on untransfected cells. The two hybridomas 8 G8 and 4 G5 were identified by this strategy (Fig. 2b). Both mab did not stain a cell line that stably expressed the B-NK C-type lectin fused to a V5 epitope in order to exclude the possibility of a cross reactivity with the V5 epitope (data not shown). Since both supernatants showed identical staining patterns of cell lines and primary cells, further analyses were all performed with the 8 G8 mab, a mouse IgG2a isotype.

Chicken CLEC2 is expressed as highly glycosylated homodimer

The 293-CLEC2 cells were employed for biochemical detection of the molecule. Under non-reducing conditions, the immunoprecipitated molecules that were detected with an anti-V5 HRP conjugate migrated as a broad protein band of approximately 70 to 80 kDa (Fig. 2). Following reduction, there was a major protein visible at 38 kDa and an additional reactive protein species with slightly higher M_R . These migration patterns can be due to differential glycosylation that is known to be present in C type lectins. In order to examine the effect of N-glycosylation, the immunoprecipitates were deglycosylated with PNGase F. The addition of PNGase F resulted in a single protein band with an apparent M_R of approximately 32 kDa (Fig. 2). This M_R matches the theoretical M_R calculated to be 26.2 kDa for CLEC-2 that is further increased to 31.1 kDa by the addition of a linker and

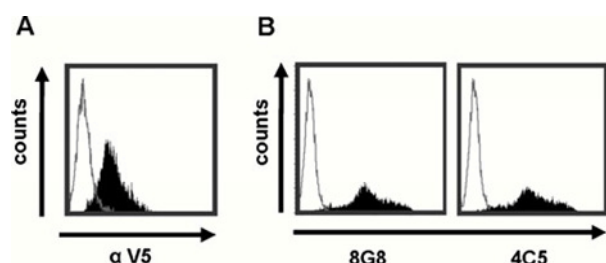


Fig. 1 8G8 and 4 C5 mabs specifically recognize CLEC-2. a Anti-V5 staining of either untransfected HEK-293 T cells (open histogram) or stably transfected 293-CLEC-2 cells (shaded histogram). b Reactivity of mabs 8 G8 and 4 C5 on 293-CLEC-2 cells (shaded histograms) as compared to control staining (open histograms)

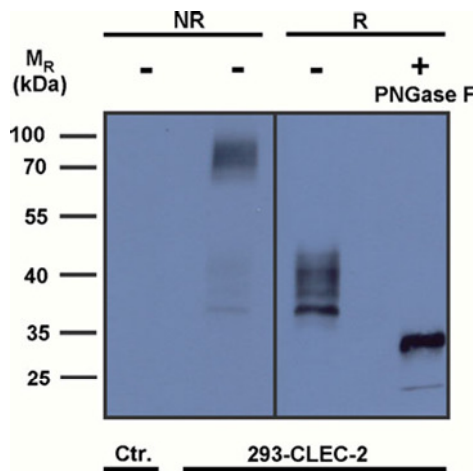


Fig. 2 CLEC-2 represents a heavily glycosylated homodimeric protein. 293-CLEC-2 cells were lysed, immunoprecipitated and size-fractionated by PAGE under non-reducing (NR) and reducing (R) conditions on separate gels as depicted by frames. Deglycosylation with PNGase F was performed as indicated (multiplication sign). The control immunoprecipitation (Ctr.) was performed with mock transfected 293 T cells

the V5 tag. In conclusion, the chicken CLEC-2 molecule is present on the surface as highly glycosylated homodimer.

CLEC-2 is expressed by thrombocytes

In the next step of our analysis, the CLEC-2-specific mab was used to perform single and double immunofluorescence staining on primary cells isolated from various organs of adult chickens and embryos. In single colour immunofluorescence staining, the 8 G8 mab reacted with a large population of PBMC, a small splenocyte subset, and it did not stain bursal cells or thymocytes (Fig. 3). Chicken blood can be prepared by two distinct ways, either by density centrifugation resulting in a mixture of cells including lymphocytes, monocytes and in particular a high frequency of nucleated thrombocytes, or by a method called slow speed centrifugation which yields a rather pure preparation of lymphocytes

(Viertlboeck and Göbel 2007). Staining with the 8 G8 mab was only observed for the blood prepared by density centrifugation, thus indicating the reactivity with thrombocytes (data not shown). Since a gene with large homology to chicken CLEC-2 is also present in turkey, we also tested if the mab against chicken CLEC-2 would crossreact with turkey thrombocytes. As shown in Fig. 3, the 8 G8 mab also reacted with turkey cells.

We next employed the 8 G8 mab in combination with various mab against defined chicken surface antigens in order to further characterize the 8 G8-positive cells in several tissues. In PBMC, the mab K1, known to stain thrombocytes, monocytes and macrophages, virtually labelled all cells expressing CLEC-2 when gating on the lymphoid gate (Fig. 4), again indicating thrombocyte expression of CLEC-2. In order to test, whether CLEC-2 is also expressed on monocytes, PBMC were stained with 8 G8 in combination with the monocyte/macrophage specific KUL01 mab. Analysis of the monocyte gate revealed that KUL01-positive cells lack CLEC-2 expression in PBMC, and likewise KUL01 and CLEC-2 double positive only represented a minute fraction in the spleen (Fig. 4). To further evaluate if CLEC-2 would be upregulated on macrophages, monocyte-derived macrophages were obtained by in vitro culture and stained after 3 days with KUL01 and 8 G8, but these cells albeit KUL01 positive were 8 G8 negative.

As a next step, we wanted to examine if CLEC-2 in addition to its presence on thrombocytes is also expressed on NK cells. Chicken NK cells are found in organs such as intestine, lung and embryonic spleen (Göbel et al. 1994, 2001; Jansen et al. 2010). In intestine, there is a rather big NK population detected by the 28-4 mab, but 8 G8 staining virtually detected no cells (Fig. 4). Freshly isolated embryonic spleen cells harbour NK cells which express CD8 (Göbel et al. 1994), but these cells did not express CLEC-2 (Fig. 4). Finally, lung cells were stained with combinations of either CD8 and 8 G8 or 28-4 and 8 G8.

In lung, NK cells have not been intensively characterized, and suitable markers for the detection of NK cells are not

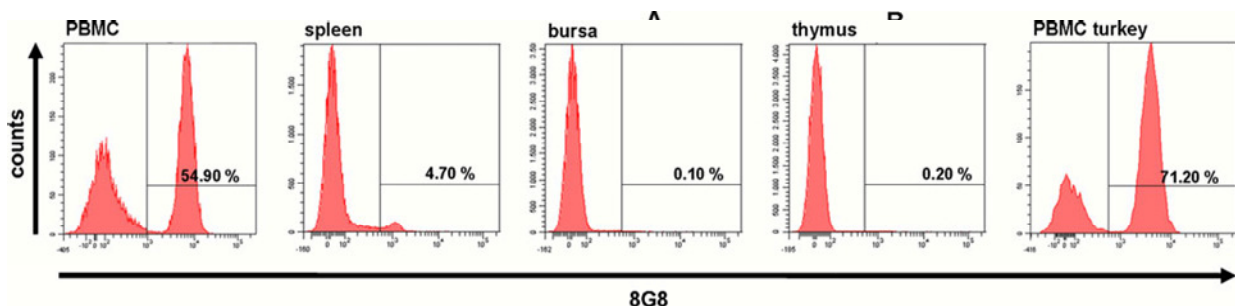
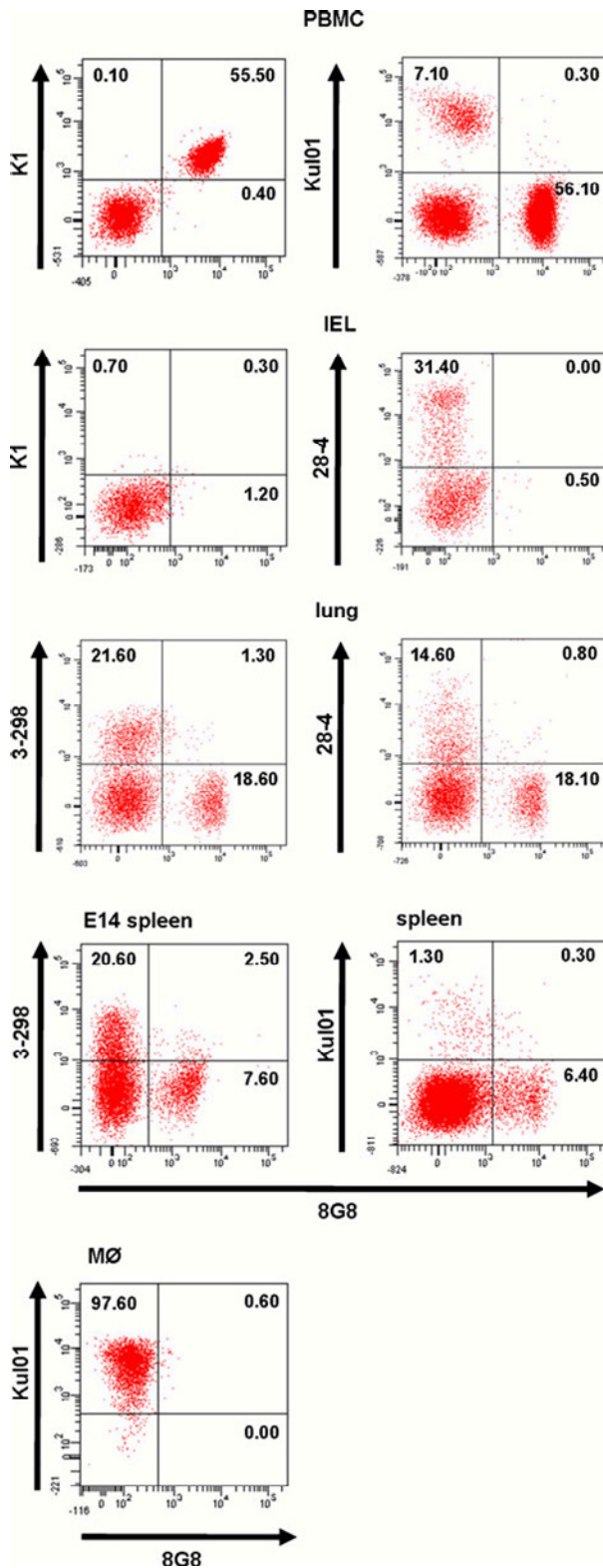


Fig. 3 CLEC-2 expression on PBMC and splenocytes. Single-cell suspensions of chicken and turkey blood (PBMC) and chicken spleen, bursa and thymus were stained with the 8 G8 mab and analysed by

flow cytometry. The marker was set according to a control performed with an isotype-matched negative control



R Fig. 4 CLEC-2 is expressed by chicken thrombocytes. Double fluorescence analysis of PBMC, intestinal epithelial lymphocytes (IEL), lung cells, embryonic day 14 splenocytes (E14), adult splenocytes and in vitro cultures macrophages (MØ) using the 8 G8 mab in conjunction with the markers indicated. The markers were set according to isotype-matched negative controls

available. NK cells in other organs have been characterized as CD8⁺, but these cells do not express CLEC-2. Since CD8 is thought to be downregulated in activated NK cells, we also employed 28-4 as a potential marker, but again, most of the 28-4⁺ cells did not express CLEC-2. Finally, the CLEC-2-positive cells all expressed K1 as in PBMC (data not shown). In conclusion, chicken CLEC-2 seems to be mainly expressed only by thrombocytes.

CLEC-2 crosslinking activates thrombocytes

Human CLEC-2 expressed by platelets is known to bind to various ligands such as podoplanin and to cause activation of thrombocytes following ligand recognition. CD107 is expressed on the surface of activated platelets and could therefore serve as a thrombocytes activation marker (Febbraio and Silverstein 1990; Nieuwenhuis et al. 1987). In order to examine if chicken thrombocytes can be activated by CLEC-2, PBMC were incubated with the 8 G8 mab and a crosslinking mab for different time points. Degranulation of thrombocytes was monitored by surface expression of the lysosomal protein CD107. Twenty minutes after crosslinking, a fraction of the thrombocytes representing approximately 38% of the entire thrombocytes population expressed CD107 (Fig. 5), whereas cells that were incubated with a control mab instead of 8 G8 did only show minimal CD107 expression. After longer incubation times such as 30 min, the frequency of CD107-positive cells decreased (data not shown). We conclude that CLEC-2 ligation activates thrombocytes to degranulate.

Discussion

The NKC complex is a major site of NK cell receptor genes in mammals. It has been demonstrated that the genomic content between species is highly variable. The most striking example is the difference found for Ly49 that represented by a single pseudogene in man, but present in multiple functional copies in mice (Trowsdale et al. 2001). Therefore, an analysis of the syntenic region in chickens may provide novel insights into the evolution of NK receptor genes. It is a surprising finding that the chicken NKC only contains two C type lectin-like genes, one of which can be unequivocally assigned as CD69 homologue (Chiang et al. 2007). The second gene shares

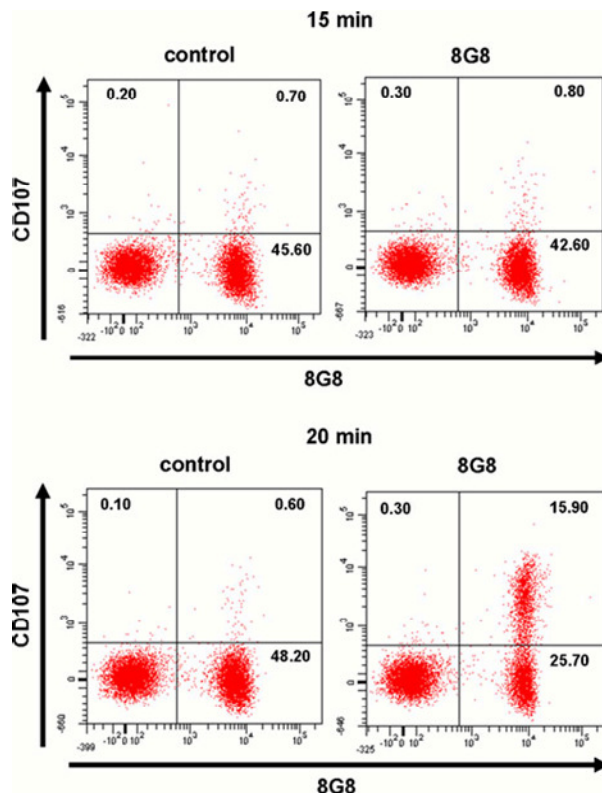


Fig. 5 CLEC-2 crosslinking causes thrombocyte degranulation. Blood thrombocytes were crosslinked with the 8 G8 mab followed by anti-Ig-FITC conjugate and simultaneously stained with a mab detecting chicken CD107 to assay for lysosomal proteins on the cell surface as tool to detect degranulation for the time points indicated. The control was performed identically, but in the presence of an irrelevant mab

some homology to CD94 and NKG2 and it also to a previously identified C-type lectin in teleostean fish (Sato et al. 2003).

Our attempts to further characterize this gene started from the assumption that the C-type lectin in fact represents a CD94/NKG2 hybrid. The preliminary mRNA expression analysis depicted in the original publication also suggests a limited expression pattern mainly in lung and blood as expected for a NK cell marker. Staining with the specific mab, however, identified thrombocytes as the major cellular source expressing the molecule. NK cells that are infrequent in the chicken blood and spleen but found in decent numbers in intestine, lung and embryonic spleen did not react with the 8 G8 mab. The analysis of chicken NK cells is hampered by the lack of appropriate NK cell-specific markers. CD8 is not specific for NK cells, and it has also been speculated that it can be downregulated on activated NK cells (Jansen et al. 2010). 28-4 can be used as marker of intestinal NK cells, but it is expressed on other cell types in the periphery (Jansen et al. 2010). Lung NK cells have not been intensively characterized at all in the chicken. Our conclusion that CLEC-2 is not expressed on NK cells is thus based on the following arguments: The 28-4

antigen is expressed on cells in the intestine and lung, but none of these cells coexpresses CLEC-2. Moreover, virtually all CD8+ cells in embryonic spleen and lung are CLEC-2 negative. Finally, all CLEC-2-positive cells are also stained with the K1 mab known to be expressed by thrombocytes. Therefore, the well-characterized NK cell populations in the embryonic spleen expressing CD8 and the intestinal 28-4+ NK cells both lack CLEC-2, and all the lung cells expressing CLEC-2 coexpress the thrombocyte marker K1, thus indicating a lack of CLEC-2 on NK cells. An expression of CLEC-2 on a minority of NK cells cannot be excluded currently due to a lack of appropriate markers.

This expression pattern of a C-type lectin mainly expressed on thrombocytes forced us to re-examine the classification as CD94/NKG2 hybrid. The cellular expression is more alike mammalian CLEC-2 that was originally identified in a screen for NK cell receptors and later found to be expressed on some NK cell clones, monocytes, neutrophils, liver Kupffer cells and platelets (Colonna et al. 2000; Kerrigan et al. 2009; Suzuki-Inoue et al. 2006). This expression pattern does not entirely reflect that of chicken CLEC-2, since we cannot detect chicken CLEC-2 on monocytes. It is generally accepted that the comparison of staining patterns of CD antigens is highly variable between species and therefore staining properties can only serve as one argument.

The location within a region syntenic to the mammalian NKC does not provide any help to assign a clear orthologue, since the order of the genes has not been conserved over more than 300 Ma of evolution. Also, the sequence comparisons of the chicken CLEC-2 with mammalian C-type lectins do not provide a clue regarding the exact assignment, since the chicken CLEC-2 and various mammalian C-type lectins share only about 30% identical amino acids, including three pairs of correctly spaced cysteine residues forming disulfide bridges to stabilize the C-type domain (Fig. 6a). There are, however, some features in the chicken CLEC-2 sequence that are also typical for human CLEC-2. Apart from the three cysteine pairs (Fig. 6a, labelled as 1, 2 and 3), the CLEC-2 sequences of rat, mouse and man possess two additional cysteine residues, one in exon 3 and one in exon 4. The latter is also present in CD94, but the exon 3 cysteine is typical for CLEC-2 (Flornes et al. 2010). Both these cysteines can be found in similar positions in the chicken CLEC-2 (Fig. 6a, labelled by arrowheads).

The most important feature is the so-called hem immunoreceptor tyrosine-based activation motif (hemITAM) that consists of a single YXXL motif and is only present in Dectin-1, CLEC9A and CLEC2. As depicted in Fig. 6b, the N-terminal tyrosine residue in CLEC-2 resembles such a hemITAM rather than a classical immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM), since it lacks important residues of the signature sequence as opposed to the C-type lectin B-NK. Dectin-1 is found on neutrophils, macrophages and

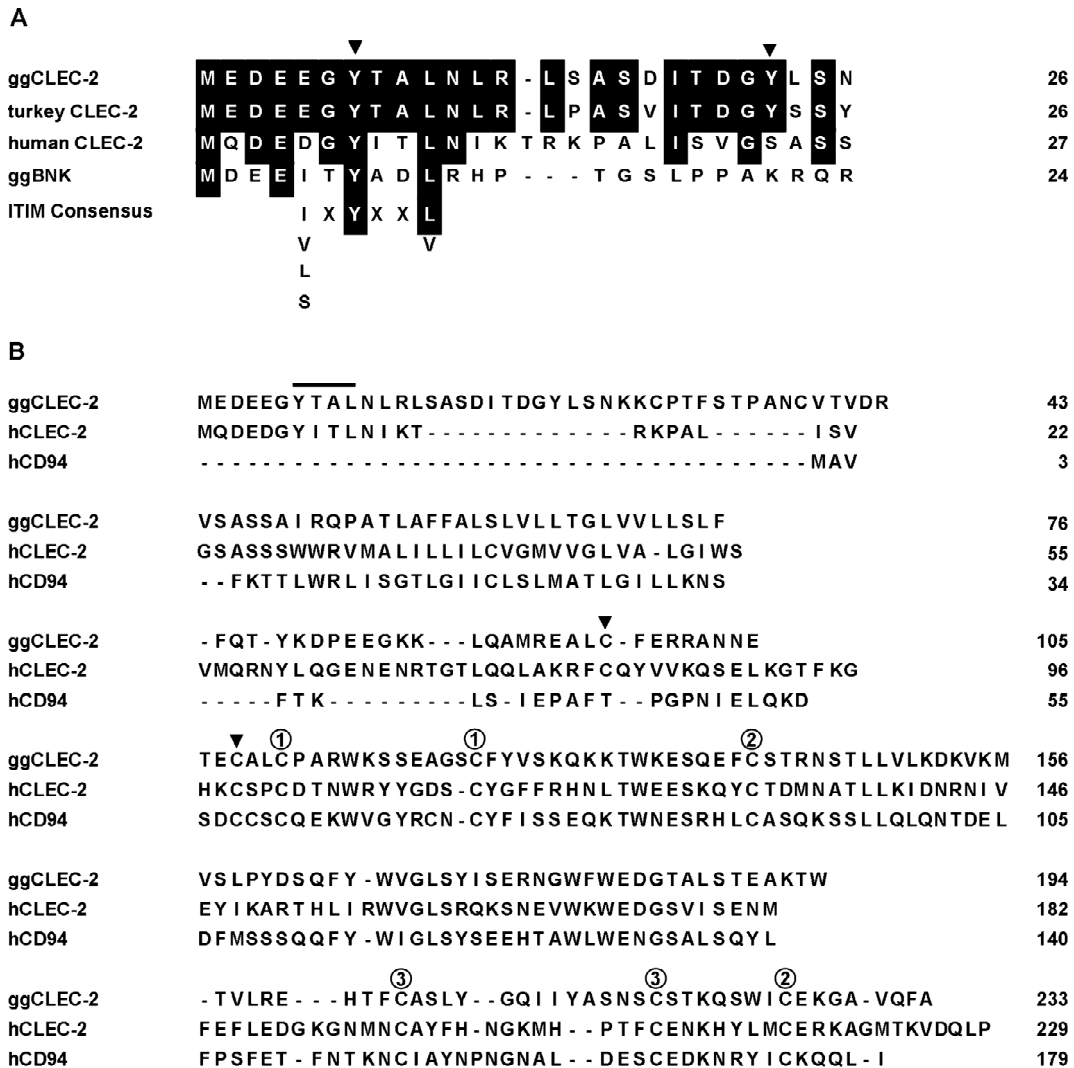


Fig. 6 Sequence alignments show relation of chicken and human CLEC-2. a The exon sequences of chicken CLEC-2 (accession number ABB02672), human CLEC-2 (NP_057593) and human CD94 (NP_002253) were aligned separately using the CLUSTAL W algorithm. The hemITAM is marked by a line above the sequence; the three disulfide bonds are indicated by numbers and the extra cysteines by arrowheads. For CLEC-2, the sequences of exons 1 to 6 were used, whereas for CD94 the exons 2 to 7. b A part of the cytoplasmic domain

sequences of the chicken CLEC-2 (ggCLEC-2) was aligned to the corresponding turkey and human CLEC-2 sequence and the chicken B-NK lectin. The signature of an ITIM is given for comparison. The E at position -2 reinforces the interpretation of the motif as an hemITAM in contrast to a endocytosis motif with otherwise similar features (Li et al. 2000). Arrows mark the intracellular tyrosines present in the sequence note that the second tyrosine CLEC-2 is not part of an ITIM or hemITAM consensus sequence

dendritic cells, whereas CLEC9A is solely expressed by dendritic cells, but both are absent from platelets (Sancho et al. 2009; Taylor et al. 2002). The combination of expression on platelets/thrombocytes and presence of a hemITAM is thus only found for CLEC-2. The inspection of the cytoplasmic region containing the hemITAM reveals striking similarities between chicken CLEC-2, the corresponding mammalian sequences and a turkey homologue that is present in the genome sequence (Fig. 6b, accession number XP_003202675). In all cases, a patch of three acidic

residues at the position -4to-2 in respect to the tyrosine is present that may influence the binding of an adaptor molecule following phosphorylation of the tyrosine residue. Recent studies have demonstrated that the hemITAM phosphorylation of CLEC-2 is mediated by Syk and not Src family kinases (Severin et al. 2011), thus indeed stressing the unique nature of this signalling motif in contrast to other activating platelet receptors such as GPVI that signals via the Fc chain containing a full ITAM. Moreover, the homodimerization observed for the chicken CLEC-2 is also found

for mammalian cells, where it has been demonstrated to be essential for the hemITAM function (Hughes et al. 2010). In the chicken CLEC-2, there is an additional tyrosine residue in the cytoplasmic domain that together with the tyrosine in the hemITAM was interpreted as potential ITIM-like sequence; however, it does not resemble the ITIM signature (Fig. 6b).

So the evidence for the assignment of the chicken NKC lectin to CLEC-2 includes the extra cysteines in the extracellular domain, the hemITAM and the expression on thrombocytes. This would leave the chicken NKC without a gene expressed as NK cell receptor, and thus, the name NKC for this syntenic region would be incorrect. In contrast, the chicken LRC as second major site for NK cell receptor genes has been massively expanded (Viertlboeck et al. 2005). It has been demonstrated by comparative genomics that the LRC originates from a single chromosomal region already present in the tunicate genome, thus providing evidence for an ancient receptor locus that may have encoded NK cell receptor homologues in non-vertebrate species (Zucchetti et al. 2009). It is also interesting to note that both genomic areas that are encoding NK cell receptor genes also contain receptor genes important for platelet activation exemplified by the LRC member GPVI and the NKC gene encoding CLEC-2, a finding that may underline novel activities of thrombocytes or platelets during immune responses. In fact, several other molecules such as TREM or a novel chicken Fc receptor have been described on chicken thrombocytes, and similar molecules are also found on platelets (Viertlboeck et al. 2006, 2009a). Finally, there are other putative NK cell receptors that are dispersed throughout the genome, which may be unique to the chicken such as the B-NK C-type lectin (Rogers et al. 2005) or that represent homologues of well-known mammalian proteins such as the TREM or CD200 family (Viertlboeck et al. 2006, 2008).

In conclusion, our studies provide evidence for the presence of a CLEC-2 homologue in the chicken that was previously thought to resemble a CD94/NKG2 hybrid. This novel assignment, together with the data regarding cellular expression and function, provides novel insights into the phylogeny of NK cell receptor genes and potential functions of thrombocytes during immune responses.

Acknowledgements This study was supported by a grant of Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG GO489/5-1.

References

- Barrow AD, Trowsdale J (2008) The extended human leukocyte receptor complex: diverse ways of modulating immune responses. *Immunol Rev* 224:98–123
- Chiang HI, Zhou H, Raudsepp T, Jesudhasan PR, Zhu JJ (2007) Chicken CD69 and CD94/NKG2-like genes in a chromosomal region syntenic to mammalian natural killer gene complex. *Immunogenet* 59:603–611
- Colonna M, Samaridis J, Angman L (2000) Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 30:697–704
- Febbraio M, Silverstein RL (1990) Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem* 265:18531–18537
- Flornes LM, Nylenna O, Saether PC, Daws MR, Dissen E, Fossum S (2010) The complete inventory of receptors encoded by the rat natural killer cell gene complex. *Immunogenet* 62:521–530
- Göbel TW, Chen CL, Shrimpf J, Grossi CE, Bernot A, Bucy RP, Auffray C, Cooper MD (1994) Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex. *Eur J Immunol* 24:1685–91
- Göbel TW, Kaspers B, Stangassinger M (2001) NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol* 13:757–762
- Hughes CE, Pollitt AY, Mori J, Eble JA, Tomlinson MG, Hartwig JH, O'Callaghan CA, Futterer K, Watson SP (2010) CLEC-2 activates Syk through dimerization. *Blood* 115:2947–2955
- Jansen CA, van de Haar PM, van Haarlem D, van Kooten P, de Wit S, van Eden W, Viertlboeck BC, Göbel TW, Vervelde L (2010) Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. *Dev Comp Immunol* 34:759–767
- Kaspers B, Lillehoj HS, Lillehoj EP (1993) Chicken macrophages and thrombocytes share a common cell surface antigen defined by a monoclonal antibody. *Vet Immunol Immunopathol* 36:333–346
- Kelley J, Walter L, Trowsdale J (2005) Comparative genomics of natural killer cell receptor gene clusters. *PLoS Genet* 1:129–139
- Kerrigan AM, Dennehy KM, Mourao-Sa D, Faro-Trindade I, Willment JA, Taylor PR, Eble JA, Reis e Sousa C, Brown GD (2009) CLEC-2 is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 182:4150–4157
- Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9:495–502
- Li Y, Marzolo MP, van Kerkhof P, Strous GJ, Bu G (2000) The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 275:17187–17194
- Li Z, Nestor KE, Saif YM, Fan Z, Luhtala M, Vainio O (1999) Cross-reactive anti-chicken CD4 and CD8 monoclonal antibodies suggest polymorphism of the turkey CD8alpha molecule. *Poult Sci* 78:1526–1531
- Ljunggren HG, Karre K (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237–44
- Lochner KM, Viertlboeck BC, Göbel TW (2010) The red jungle fowl leukocyte receptor complex contains a large, highly diverse number of chicken immunoglobulin-like receptor (CHIR) genes. *Mol Immunol* 47:1956–1962
- Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJ, Rozemuller E, van Iwaarden F, Sixma JJ (1987) Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood* 70:838–845
- Parham P (2008) The genetic and evolutionary balances in human NK cell receptor diversity. *Semin Immunol* 20:311–316
- Peck R, Murthy KK, Vainio O (1982) Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs. *J Immunol* 129:4–5
- Rogers S, Göbel TW, Viertlboeck BC, Milne S, Beck S, Kaufman J (2005) Characterisation of the C-type lectin-like receptors B-NK and B-lec suggests that the NK complex and the MHC share a common ancestral region. *J. Immunol.* 174
- Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernandez-Falcon P, Rosewell I, Reis e Sousa C (2009) Identification of a

Immunogenetics

- dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458:899–903
- Sato A, Mayer WE, Overath P, Klein J (2003) Genes encoding putative natural killer cell C-type lectin receptors in teleostean fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7779–7784
- Severin S, Pollitt AY, Navarro-Nunez L, Nash CA, Mourao-Sa D, Eble JA, Senis YA, Watson SP (2011) Syk-dependent phosphorylation of CLEC-2: a novel mechanism of hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling. *J Biol Chem* 286:4107–4116
- Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Garcia A, Eble JA, Pohlmann S, Inoue O, Gartner TK, Hughan SC, Pearce AC, Laing GD, Theakston RD, Schweighoffer E, Zitzmann N, Morita T, Tybulewicz VL, Ozaki Y, Watson SP (2006) A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood* 107:542–549
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169:3876–3882
- Trowsdale J, Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ (2001) The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev* 181:20–38
- Viertlboeck BC, Crooijmans RP, Groenen MA, Göbel TW (2004) Chicken Ig-like receptor B2, a member of a multigene family, is mainly expressed on B lymphocytes, recruits both Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1 and SHP-2, and inhibits proliferation. *J Immunol* 173:7385–7393
- Viertlboeck BC, Gick CM, Schmitt R, Du Pasquier L, Göbel TW (2010) Complexity of expressed CHIR genes. *Dev Comp Immunol* 34:866–873
- Viertlboeck BC, Göbel TW (2007) Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Vet Immunol Immunopathol* 119:137–141
- Viertlboeck BC, Habermann FA, Schmitt R, Groenen MA, Du Pasquier L, Göbel TW (2005) The chicken leukocyte receptor complex: a highly diverse multigene family encoding at least six structurally distinct receptor types. *J Immunol* 175:385–393
- Viertlboeck BC, Hanczaruk MA, Schmitt FC, Schmitt R, Göbel TW (2008) Characterization of the chicken CD200 receptor family. *Mol Immunol* 45:2097–2105
- Viertlboeck BC, Schmitt R, Göbel TW (2006) The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L. *Immunogenet* 58:180–190
- Viertlboeck BC, Schmitt R, Hanczaruk MA, Crooijmans RP, Groenen MA, Göbel TW (2009a) A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters. *J Immunol* 182:1533–1540
- Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Hanczaruk MA, Schmitt R, DuPasquier L, Herberg FW, Göbel TW (2007) The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11718–11723
- Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Schmitt R, Herberg FW, Göbel TW (2009b) The chicken leukocyte receptor complex encodes a family of different affinity FcY receptors. *J Immunol* 182:6985–6992
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44–49
- Yoder JA, Litman GW (2011) The phylogenetic origins of natural killer receptors and recognition: relationships, possibilities, and realities. *Immunogenet* 63:123–141
- Yokoyama WM, Plougastel BF (2003) Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3:304–316
- Zucchetti I, De Santis R, Grusea S, Pontarotti P, Du Pasquier L (2009) Origin and evolution of the vertebrate leukocyte receptors: the lesson from tunicates. *Immunogenet* 61:463–481

4 Diskussion

Der auf dem NKC des Huhnes codierte und zuvor als CD94/NKG2 Hybrid beschriebene Rezeptor wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers charakterisiert. Davon ausgehend, dass es sich um einen NK Zell Marker handeln würde, war es überraschend, dieses Molekül auf Thrombozyten exprimiert zu finden. C-typ Lektine verschiedener Spezies weisen nur eine geringe Menge übereinstimmender Aminosäuren auf. Um homologe Moleküle ausfindig machen zu können, ist das alleinige Heranziehen eines Sequenzvergleichs der Aminosäuren kaum Erfolg versprechend. Einzelne charakteristische und für die Funktion entscheidende Strukturen sind oft sehr konserviert. Zieht man diese bei der Sequenzanalyse des auf Thrombozyten exprimierten Rezeptors heran, erhält man mehr Hinweise für eine Übereinstimmung mit einem CLEC-2 Molekül des Menschen, denn mit CD94 oder NKG2. Alle drei Rezeptoren teilen das Vorkommen von drei Cysteinpaaren, CLEC-2 hat darüber hinaus zwei weitere Cysteine, eins in Exon drei und eins in Exon vier. CD94 besitzt nur das Cystein in Exon drei. Die Sequenz für das Huhn ist diesbezüglich mehr der Sequenz des CLEC-2 ähnlich, da sie an vergleichbarer Position in Exon drei und Exon vier ebenfalls ein Cystein aufweist. Das signalgebende Motiv im zytoplasmatischen Teil der Sequenz beim Huhn ist dem eines hemITAM vergleichbar und weist keine Übereinstimmung mit einem ITAM oder einem ITIM Motiv von CD94 oder NKG2 auf. Unter den C-typ Lektinen, welche ein hemITAM Motiv besitzen, ist eins auf Thrombozyten nachweisbar, das CLEC-2. Die anderen beiden Rezeptoren DECTIN1 und CLEC9A werden von anderen Zellen exprimiert. Darüber hinaus weist der Bereich vor dem hemITAM Motiv eine Reihe saurer Aminosäuren auf. Eine solche Region könnte als charakteristisch für die Erkennung und Aktivierung über Syk Kinasen angesehen werden, was für andere Moleküle welche ebenfalls ein hemITAM Motiv aufweisen, beschrieben ist. Zusammengenommen geben diese Merkmale Hinweise darauf, dass der Rezeptor ein Homolog zum CLEC-2 des Menschen darstellt. Das CLEC-2 des Menschen ist neben Thrombozyten auch auf einer Reihe weiterer Zellpopulationen exprimiert, darunter Monozyten, Makrophagen, Neutrophile

und NK Zellen. Beim Huhn war der Rezeptor nur auf Thrombozyten nachweisbar, Monozyten und Makrophagen können nach Testung ausgeschlossen werden. Aufgrund von fehlenden Markern konnte nicht getestet und ausgeschlossen werden, dass CLEC-2 auch von Heterophilen exprimiert wird. NK Zellen beim Huhn kommen hauptsächlich in intestinalen epithelialen Lymphozyten (IEL), Zellen der Lunge und der Milz von Embryonen vor. In Milzzellen von Hühnerembryonen sind NK Zellen als CD3 (intrazytoplasmatisch) und CD8 positive Zellen definiert worden, die keinen TCR auf der Zelloberfläche besitzen. Diese als TCR0 bezeichneten Zellen finden sich in der Milz zu einem Zeitraum, an welchem T Zellen noch nicht den Thymus verlassen haben und in die Peripherie gewandert sind [102-104]. Milzzellen von Hühnerembryonen konnten bei der Durchflußzytometrischen Messung mit dem CLEC-2 spezifischen monoklonalen Antikörper nicht angefärbt werden. Bei adulten Hühnern sind die TCR0 Zellen hauptsächlich in der IEL Population mit einer recht hohen Frequenz vorhanden und können mit dem monoklonalen Antikörper 28-4 gefärbt werden [105]. 28-4 positive Zellen sind möglicherweise mit einer Subpopulation von NK Zellen vergleichbar, die bei Mensch und Maus in der Lamina propria des Dünndarms, Mesenteriallymphknoten, Peyerschen Platten und Tonsillen vorkommen. Charakteristisch für diese Subpopulation ist die Produktion von Zytokinen wie IL-22 und IL-17, womit sie sich von NK Zell Populationen in Blut und Milz, unterscheiden [106-107]. Bisherige Experimente konnten keine CLEC-2 positiven Zellen in der IEL Population ausfindig machen. CLEC-2 positive Zellen, welche in der Lunge gefärbt wurden, waren 28-4 und CD8 negativ und ließen sich mit dem Thrombozyten Marker K1 anfärben. 28-4 positive Zellen repräsentieren intestinale NK Zellen, somit stellt dieser Antikörper vermutlich kein geeigneter Marker für NK Zellen der Lunge dar. Der CD8 Marker ist nicht spezifisch für NK Zellen und es gibt Hinweise, dass aktivierte NK Zellen den Rezeptor herunterregulieren [108]. Insbesondere in der Lunge fehlen geeignete Marker, um NK Zellen ausfindig machen zu können. Dennoch geben alle bisher gewonnenen Daten keinen Hinweis darauf, dass der Rezeptor von NK Zellen exprimiert wird. Der NKC des Huhnes weist lediglich zwei C-typ

Lektine auf, darunter CD69, welches als NK Zellrezeptor ausgeschlossen werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der zweite Vertreter, das CLEC-2 Molekül, ebenfalls nicht als NK Zellrezeptor in Betracht gezogen werden kann. Die zum NKC des Menschen syntenische Region des Huhnes codiert damit nicht für NK Zell Rezeptoren. Geeignete Kandidaten sind möglicherweise in anderen Bereichen des Hühnergenoms, lokalisiert. Darunter der LRC, welcher als sehr ursprünglicher Genort angesehen werden kann [109] und beim Huhn eine Vielzahl Hühner Ig-ähnlichen Rezeptoren (CHIR) beherbergt [110]. Beiden Regionen, dem NKC und dem LRC, ist gemeinsam, dass sie ebenfalls für Rezeptoren codieren, die für die Thrombozytenaktivierung entscheidend sind. Darunter GPVI ein Mitglied der Immunglobulin Superfamilie und das C-typ Lektin CLEC-2 auf dem NKC. Darüber hinaus konnten weitere Rezeptoren wie TREM oder ein Hühner Fc Rezeptor auf Hühner Thrombozyten nachgewiesen werden [111-112]. Möglicherweise besitzen Thrombozyten eine bisher unterschätzte Rolle für das Immungeschehen.

5 Zusammenfassung

Das Hühner CLEC-2 Homolog: Ein Thrombozytenrezeptor mit aktivierender Funktion

Der Natürliche Killer Gen Komplex (NKC) des Huhnes ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert und weist zwei C-typ Lektine auf, von denen das eine als Homolog zu CD69 und das andere zu CD94 und NKG2 beschrieben worden ist. Diese Studie trägt durch die Generierung eines spezifischen monoklonalen Antikörpers zur Charakterisierung des Hühner C-typ Lektin ähnlichen Proteins CD94/NKG2 als potentiellen NK Zellrezeptor bei. Durchflußzytometrische Messung von lymphatischem Gewebe des Huhnes ergab, dass das C-typ Lektin von einer Vielzahl von Zellen des PBMC, wenigen Milzzellen und keinerlei Bursa- oder Thymuszellen exprimiert wird. In PBMC von Huhn und Pute konnte der monoklonale Antikörper auf Thrombozyten nachgewiesen werden. Die biochemische Analyse konnte zeigen, dass das Molekül als ein glykosyliertes Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert wird und durch Kreuzvernetzung Thrombozyten aktiviert werden, was über CD107 Expression gemessen wurde. Die Sequenzanalyse deutete auf ein Motiv im Zytoplasma hin, welches als hem Immunrezeptor Tyrosin-basierendes aktivierendes Motiv bei C-typ Lekinen wie DECTIN1 und CLEC-2 vorkommt, aber nicht für CD94/NKG2 beschrieben ist. In der Sequenz konnte ein zusätzliches Cystein im extrazellulären Bereich gefunden werden. Zusammengenommen geben diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass das Gen nicht einem CD94/NKG2 Hybrid ähnlich ist, sondern ein CLEC-2 Homolog darstellt.

6 Summary

Chicken CLEC-2 homologue: a thrombocyte receptor with activation function

The chicken NKC was described to consist of only two C-type lectins, CD69 and a CD94/NKG2 hybrid, both encoded on chromosome 1. This study contributes to the characterisation of the chicken C-type lectin CD94/NKG2 by production of a specific monoclonal mab which was used to analyse the potential function on NK cells. Immunofluorescent analysis of lymphoid chicken tissues revealed in expression of the C-type lectin on a large percentage of PBMC, a small percentage of splenocytes and no reactivity in bursa and thymus. In chicken and turkey PBMC, the mab reacted with virtually all thrombocytes. The biochemical analyses demonstrated that CLEC-2 is presented on the cell surface as a highly glycosylated homodimer, which upon mab crosslinking induced thrombocyte activation, as measured by CD107 expression. Sequence analysis indicated a cytoplasmic motif known as hem immunoreceptor tyrosine-based activation motif (hemITAM), which was found to be presented in C-type lectins like DECTIN1 and CLEC-2 but not CD94/NKG2. In addition the sequence exhibits a further extracellular cysteine residue. These findings indicate that the gene may not resemble CD94/NKG2 but rather CLEC-2 homologue.

7 Literaturverzeichnis

1. Herberman, R.B., M.E. Nunn, and D.H. Lavrin, *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity*. Int J Cancer, 1975. **16**(2): p. 216-29.
2. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, "*Natural*" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 112-7.
3. Lanier, L.L., *Evolutionary struggles between NK cells and viruses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 259-68.
4. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
5. Lin, W., H. Zhang, and G. Beck, *Phylogeny of natural cytotoxicity: cytotoxic activity of coelomocytes of the purple sea urchin, Arbacia punctulata*. J Exp Zool, 2001. **290**(7): p. 741-50.
6. Khalturin, K., et al., *Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of Botryllus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(2): p. 622-7.
7. Cooper, E.L., et al., *Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562*. Cell Immunol, 1995. **166**(1): p. 113-22.
8. Janeway, C.A., *Natural killer cells: a primitive immune system*. Nature, 1989. **341**(6238): p. 108.
9. Anderson, P., et al., *CD3-negative natural killer cells express zeta TCR as part of a novel molecular complex*. Nature, 1989. **341**(6238): p. 159-62.
10. Terme, M., et al., *Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 486-94.
11. Lisnic, V.J., A. Krmpotic, and S. Jonjic, *Modulation of natural killer cell activity by viruses*. Curr Opin Microbiol, 2010. **13**(4): p. 530-9.
12. Sharma, J.M. and B.D. Coulson, *Presence of natural killer cells in specific-pathogen-free chickens*. J Natl Cancer Inst, 1979. **63**(2): p. 527-31.
13. Sharma, J.M. and W. Okazaki, *Natural killer cell activity in chickens: target cell analysis and effect of antithymocyte serum on effector cells*. Infect Immun, 1981. **31**(3): p. 1078-85.
14. Chai, J.Y. and H.S. Lillehoj, *Isolation and functional characterization of chicken intestinal intra-epithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumour target cells*. Immunology, 1988. **63**(1): p. 111-7.
15. Lillehoj, H.S., *Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to eimerian infections in inbred chickens*. Infect Immun, 1989. **57**(7): p. 1879-84.
16. *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
17. Wong, G.K., et al., *A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 717-22.
18. Chiang, H.I., et al., *Chicken CD69 and CD94/NKG2-like genes in a chromosomal region syntenic to mammalian natural killer gene complex*. Immunogenetics, 2007. **59**(7): p. 603-11.
19. Sun, J.C. and L.L. Lanier, *NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells*. Nat Rev Immunol, 2011.
20. Paust, S. and U.H. von Andrian, *Natural killer cell memory*. Nat Immunol, 2011. **12**(6): p. 500-8.
21. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
22. Lanier, L.L., *NK cell receptors*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 359-93.

23. Pegram, H.J., et al., *Activating and inhibitory receptors of natural killer cells*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 216-24.
24. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
25. Watzl, C., *The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"?* Microbes Infect, 2003. **5**(1): p. 31-7.
26. Karre, K., *Natural killer cell recognition of missing self*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 477-80.
27. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
28. 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.
29. Long, E.O., *Regulation of immune responses through inhibitory receptors*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 875-904.
30. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors*. Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
31. Wang, J.W., et al., *Influence of SHIP on the NK repertoire and allogeneic bone marrow transplantation*. Science, 2002. **295**(5562): p. 2094-7.
32. Yokoyama, W.M. and B.F. Plougastel, *Immune functions encoded by the natural killer gene complex*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 304-16.
33. Lanier, L.L., et al., *Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells*. Nature, 1998. **391**(6668): p. 703-7.
34. Arase, N., et al., *Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 1957-63.
35. Humphrey, M.B., L.L. Lanier, and M.C. Nakamura, *Role of ITAM-containing adapter proteins and their receptors in the immune system and bone*. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 50-65.
36. Vivier, E., J.A. Nunes, and F. Vely, *Natural killer cell signaling pathways*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1517-9.
37. Wende, H., et al., *Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4*. Mamm Genome, 1999. **10**(2): p. 154-60.
38. Trowsdale, J., et al., *The genomic context of natural killer receptor extended gene families*. Immunol Rev, 2001. **181**: p. 20-38.
39. Renedo, M., et al., *The human natural killer gene complex is located on chromosome 12p12-p13*. Immunogenetics, 1997. **46**(4): p. 307-11.
40. Yokoyama, W.M., et al., *cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 3229-36.
41. Yokoyama, W.M. and W.E. Seaman, *The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 613-35.
42. Zelensky, A.N. and J.E. Gready, *The C-type lectin-like domain superfamily*. FEBS J, 2005. **272**(24): p. 6179-217.
43. Hao, L., J. Klein, and M. Nei, *Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3192-7.
44. Wilhelm, B.T., L. Gagnier, and D.L. Mager, *Sequence analysis of the ly49 cluster in C57BL/6 mice: a rapidly evolving multigene family in the immune system*. Genomics, 2002. **80**(6): p. 646-61.

45. Brown, M.G., et al., *A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6*. Genomics, 1997. **42**(1): p. 16-25.
46. Arase, H., et al., *Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1323-6.
47. Smith, H.R., et al., *Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8826-31.
48. Houchins, J.P., et al., *DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells*. J Exp Med, 1991. **173**(4): p. 1017-20.
49. Lazetic, S., et al., *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4741-5.
50. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
51. Vance, R.E., et al., *Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b)*. J Exp Med, 1998. **188**(10): p. 1841-8.
52. Fang, M., et al., *CD94 is essential for NK cell-mediated resistance to a lethal viral disease*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 579-89.
53. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
54. McQueen, K.L. and P. Parham, *Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(5): p. 615-21.
55. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10*. Science, 1999. **285**(5428): p. 730-2.
56. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 495-502.
57. McFarland, B.J. and R.K. Strong, *Thermodynamic analysis of degenerate recognition by the NKG2D immunoreceptor: not induced fit but rigid adaptation*. Immunity, 2003. **19**(6): p. 803-12.
58. Jolly, C. and R.I. Morimoto, *Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(19): p. 1564-72.
59. Groh, V., et al., *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12445-50.
60. Stern-Ginossar, N., et al., *Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 1065-73.
61. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-33.
62. Amadou, C., et al., *The mouse major histocompatibility complex: some assembly required*. Immunol Rev, 1999. **167**: p. 211-21.
63. Zou, Z., et al., *Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: a novel cDNA family encodes cell surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules*. J Biochem, 1996. **119**(2): p. 319-28.
64. Malarkannan, S., et al., *The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3501-9.
65. Groh, V., et al., *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6879-84.

66. Das, H., et al., *MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function*. Immunity, 2001. **15**(1): p. 83-93.
67. Tieng, V., et al., *Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2977-82.
68. Groh, V., et al., *Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 255-60.
69. Colonna, M., J. Samaridis, and L. Angman, *Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 697-704.
70. Suzuki-Inoue, K., et al., *A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2*. Blood, 2006. **107**(2): p. 542-9.
71. Chaipan, C., et al., *DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 8951-60.
72. Tang, T., et al., *A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(7): p. 749-55.
73. Kerrigan, A.M., et al., *CLEC-2 is a phagocytic activation receptor expressed on murine peripheral blood neutrophils*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4150-7.
74. Chang, C.H., et al., *A novel mechanism of cytokine release in phagocytes induced by aggretin, a snake venom C-type lectin protein, through CLEC-2 ligation*. J Thromb Haemost, 2010. **8**(11): p. 2563-70.
75. Christou, C.M., et al., *Renal cells activate the platelet receptor CLEC-2 through podoplanin*. Biochem J, 2008. **411**(1): p. 133-40.
76. Suzuki-Inoue, K., et al., *Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 25993-6001.
77. Ozaki, Y., K. Suzuki-Inoue, and O. Inoue, *Novel interactions in platelet biology: CLEC-2/podoplanin and laminin/GPVI*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 191-4.
78. Kato, Y., et al., *Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2*. Cancer Sci, 2008. **99**(1): p. 54-61.
79. Watson, A.A., et al., *The crystal structure and mutational binding analysis of the extracellular domain of the platelet-activating receptor CLEC-2*. J Biol Chem, 2007. **282**(5): p. 3165-72.
80. Watson, S.P., et al., *GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1752-62.
81. Spalton, J.C., et al., *The novel Syk inhibitor R406 reveals mechanistic differences in the initiation of GPVI and CLEC-2 signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(7): p. 1192-9.
82. Suzuki-Inoue, K., O. Inoue, and Y. Ozaki, *Novel platelet activation receptor CLEC-2: from discovery to prospects*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 44-55.
83. Severin, S., et al., *Syk-dependent phosphorylation of CLEC-2: a novel mechanism of hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(6): p. 4107-16.
84. Watson, A.A., et al., *The platelet receptor CLEC-2 is active as a dimer*. Biochemistry, 2009. **48**(46): p. 10988-96.
85. Hughes, C.E., et al., *CLEC-2 activates Syk through dimerization*. Blood, 2010. **115**(14): p. 2947-55.
86. Dennehy, K.M., S.N. Klimosch, and A. Steinle, *Cutting edge: NKp80 uses an atypical hemi-ITAM to trigger NK cytotoxicity*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 657-61.
87. Sancho, D., et al., *Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 899-903.

88. Rogers, N.C., et al., *Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins*. *Immunity*, 2005. **22**(4): p. 507-17.
89. Huysamen, C., et al., *CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(24): p. 16693-701.
90. Fuller, G.L., et al., *The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(17): p. 12397-409.
91. Schacht, V., et al., *Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(3): p. 913-21.
92. Mishima, K., et al., *Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression*. *Acta Neuropathol*, 2006. **111**(5): p. 483-8.
93. Ozaki, Y., K. Inoue, and O. Inoue, *[Recent development in platelet functions: roles beyond thrombosis]*. *Rinsho Byori*, 2012. **60**(1): p. 52-8.
94. Hatakeyama, K., et al., *Podoplanin expression in advanced atherosclerotic lesions of human aortas*. *Thromb Res*, 2012.
95. Suzuki-Inoue, K., et al., *Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: embryonic/neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(32): p. 24494-507.
96. Bumstead, N., *Genomic mapping of resistance to Marek's disease*. *Avian Pathology*, 1998(27): p. S78-S81
97. Sato, A., et al., *Genes encoding putative natural killer cell C-type lectin receptors in teleostean fishes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(13): p. 7779-84.
98. Yoder, J.A. and G.W. Litman, *The phylogenetic origins of natural killer receptors and recognition: relationships, possibilities, and realities*. *Immunogenetics*, 2011. **63**(3): p. 123-41.
99. Rogers, S.L., et al., *Avian NK activities, cells and receptors*. *Semin Immunol*, 2008. **20**(6): p. 353-60.
100. Miller, M.M., et al., *2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex*. *Immunogenetics*, 2004. **56**(4): p. 261-79.
101. Rogers, S.L., et al., *Characterization of the chicken C-type lectin-like receptors B-NK and B-lec suggests that the NK complex and the MHC share a common ancestral region*. *J Immunol*, 2005. **174**(6): p. 3475-83.
102. Bucy, R.P., et al., *Cytoplasmic CD3+ surface CD8+ lymphocytes develop as a thymus-independent lineage in chick-quail chimeras*. *Eur J Immunol*, 1989. **19**(8): p. 1449-55.
103. Bucy, R.P., C.L. Chen, and M.D. Cooper, *Development of cytoplasmic CD3+/T cell receptor-negative cells in the peripheral lymphoid tissues of chickens*. *Eur J Immunol*, 1990. **20**(6): p. 1345-50.
104. Gobel, T.W., et al., *Characterization of avian natural killer cells and their intracellular CD3 protein complex*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(7): p. 1685-91.
105. Gobel, T.W., B. Kaspers, and M. Stangassinger, *NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken*. *Int Immunol*, 2001. **13**(6): p. 757-62.
106. Vivier, E., H. Spits, and T. Cupedo, *Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair?* *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(4): p. 229-34.
107. Colonna, M., *Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity*. *Immunity*, 2009. **31**(1): p. 15-23.

108. Jansen, C.A., et al., *Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells*. *Dev Comp Immunol*, 2010. **34**(7): p. 759-67.
109. Zucchetti, I., et al., *Origin and evolution of the vertebrate leukocyte receptors: the lesson from tunicates*. *Immunogenetics*, 2009. **61**(6): p. 463-81.
110. 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.
111. 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.
112. Viertlboeck, B.C., et al., *A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters*. *J Immunol*, 2009. **182**(3): p. 1533-40.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Göbel für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine herausragende Betreuung. Seine fortwährende fachliche Unterstützung, seine Motivation, seine Anregungen und die Bereitschaft Projektergebnisse sowie die ein oder andere NK Zelltheorie zu diskutieren, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Danken möchte ich zudem allen Mitarbeitern des Instituts für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Frau PD Dr. Birgit Viertböck danke ich für die Möglichkeit ein Auslandspraktikum während meines Studiums zu absolvieren, Dr. Sonja Härtle für ihre stete Unterstützung bei der Durchflußzytometrie und Dr. Susanne Schwarz, deren analytischer Verstand und strukturierte Arbeitsweise mir Vorbild und Motivation zu gleich waren, für ihre Ratschläge im Bereich der qPCR.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen schönen Momente, die wir miteinander verbracht haben. Mein Dank gilt insbesondere Bea Sperling für ihr Engagement bei vielversprechenden NK Zellprojekten, sowie Dr. Barbara Schreiner für die besonderen und wertvollen Momente, die mir die mitunter nötige Ablenkung verschafft haben.

Ebenfalls Dank gebührt den anderen Doktoranden für die kameradschaftliche Zusammenarbeit. Hier insbesondere Florian Busalt, Susanne Roell, Eva-Maria Rottach, Julia Schermuly und Maria Zechmann für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft.

Meinen Freunden Jens Blome, Sven Breitenfeld, Dr. Jenny Dieckmann-Rieger, Markus Geilich, Dr. Birgit Parzefall, Frauke Röttger, Ramona Schmitt, Dr. Christian Seliger und Khashayar Sultani, danke ich für ihre Loyalität und den seelischen Beistand über all die Jahre. Özgür Günes und Anastasia Kudryashova danke ich darüber hinaus für ihre Motivation, ihre Kraft und ihre Heiterkeit sowie die zahlreichen Trainingseinheiten, die mir körperlichen Ausgleich boten.

Gerhard danke ich für unzählige bereichernde kulturelle Erlebnisse, insbesondere für jene Momente, die mir die Welt der Musik näher brachten und solche, in denen sich seine erheiternde Ader entfaltete.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern Ernst und Käte für ihre liebevolle Hilfe und Aufmerksamkeit während meines Studiums und der Promotion bedanken sowie meinen Schwestern für ihre Motivation. Besonderer Dank gilt Dorothee und Katharina mit Familien, die mir stets helfend zur Seite standen und die immer ein offenes Ohr für mich hatten. Meinem Vater danke ich darüber hinaus für seinen sehr speziellen Humor und seine Lebenseinstellung, welche mir auch zukünftig ein Vorbild sein werden.